

Markierung von Steroiden
und von Ecdyson mit Tritium
und
Verteilung des markierten
Insektenhormons in Larven
von *Calliphora erythrocephala*

Rainer Maurer

München 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

MARKIERUNG VON STEROIDEN UND VON ECDYSON MIT TRITIUM
UND
VERTEILUNG DES MARKIERTEN INSEKTENHORMONS IN LARVEN
VON CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rainer Maurer
aus Ulm/Donau

München

1964



Die vorliegende Arbeit wurde selbst von mir verfasst und ist
eigentlich der Natur der Sache nach eine Arbeit, die
in der Natur der Sache selbst liegt. Die vorliegende Arbeit
ist eine Arbeit, die in der Natur der Sache selbst liegt.

Die vorliegende Arbeit ist eine Arbeit, die
eigentlich der Natur der Sache nach eine Arbeit, die
in der Natur der Sache selbst liegt. Die vorliegende Arbeit
ist eine Arbeit, die in der Natur der Sache selbst liegt.

Die vorliegende Arbeit ist eine Arbeit, die
eigentlich der Natur der Sache nach eine Arbeit, die
in der Natur der Sache selbst liegt. Die vorliegende Arbeit
ist eine Arbeit, die in der Natur der Sache selbst liegt.

Die vorliegende Arbeit ist eine Arbeit, die
eigentlich der Natur der Sache nach eine Arbeit, die
in der Natur der Sache selbst liegt. Die vorliegende Arbeit
ist eine Arbeit, die in der Natur der Sache selbst liegt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Adolf Butenandt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Eugen Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 1964

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Peter Karlson in der Zeit vom November 1961 bis zum November 1963 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Peter Karlson danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung und für das rege Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegengebracht hat.

Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt, Präsident der Max-Planck-Gesellschaft, bin ich für die wohlwollende Förderung und großzügige Erlaubnis zur Ausführung dieser Arbeit zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Martin Wenzel, Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin, spreche ich für die Einführung in die Methoden der Tritium-Markierung sowie für anregende Diskussionen meinen besonderen Dank aus.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A) Einleitung	7
Ziel der Arbeit	10
B) Allgemeiner Teil	12
I. Markierung von Steroiden und von Ecdyson mit Tritium	12
1. Allgemeines	12
a) Methoden zur Tritiummarkierung	12
b) Reaktionsbedingungen beim Tritium-Austausch nach Wilzbach - Wenzel	13
c) Reinigung tritierter Verbindungen	14
d) Messung der Radioaktivitätsverteilung auf den Dünnschichtplatten	16
2. Methodische Vorarbeiten	16
a) Wahl und Reinigung der Aktivkohle	16
b) Elution der an Aktivkohle adsorbierten Substanzen	17
c) Exposition der Adsorbate und Reaktionsgefäße	17
d) Erfahrungen mit der präparativen Dünnschichtchromatographie	18
e) Laufmittelgemische für die Dünnschicht- und Papierchromatographie	19
f) Quantitative Aufarbeitung der Dünnschichtchromatogramme	19
3. Markierungsversuche	22
a) Tritierung von Modellsteroiden nach der Kohle-Adsorptionsmethode	22
b) Tritierung des Ecdysons nach der Kohle-Methode	28
c) Tritierung des Digitogenins nach der Platin-Kohle-Methode	33
d) Tritierung des Ecdysons nach der Platin-Kohle-Methode	38
4. Diskussion	42
a) Reaktionsmechanismus und Reaktionsbedingungen bei der Tritiummarkierung nach Wilzbach	42

	Seite
b) Fortschritte und Verbesserungen der Wilzbach-Tritierung	45
c) Tritierung des Ecdysons	48
d) Autoradiographie von tritiertem Ecdyson	50
II. Verteilung von Tritium-markiertem Ecdyson in Larven von <i>Calliphora erythrocephala</i>	53
1. Problemstellung	53
2. Ergebnisse	53
a) Zeitliche Verteilung auf Hämolymphe, Epi- dermis und Fettkörper	53
b) Zeitliche Verteilung zwischen Hämolymphe, Epidermis und Fettkörper von geschnürten Larven	55
c) Verteilung auf Zellfraktionen der Epidermis und des Fettkörpers	57
3. Diskussion	58
C) Experimenteller Teil	60
I. Markierungsversuche	60
II. Analyse der Verteilung von tritiertem Ecdyson	66
D) Zusammenfassung	69
E) Literaturverzeichnis	69

A) EINLEITUNG

Die Frage nach der biochemischen Wirkungsweise körpereigener und körperfremder Stoffe, wie z.B. der Hormone, Vitamine und Pharmaka, gewinnt in heutiger Zeit zunehmend an Bedeutung. Die Beschäftigung mit diesen Problemen beansprucht nicht nur das theoretische Interesse der Grundlagenforschung, sondern zeigt sich auch richtungweisend für die praktische Entwicklung neuer Pharmaka zum Wohle des kranken Menschen.

Unter den körpereigenen Stoffen der Säugetiere erfüllen die Hormone als Entwicklungs- und Stoffwechselregulatoren vielfältige Aufgaben. Untersuchungen der vergleichenden Biochemie haben in verschiedenen Tierklassen interessante Parallelen aufgedeckt. Die Insekten als größte Tierklasse bieten sich dabei für bestimmte Problemstellungen als nahezu ideale Forschungsobjekte an: Sie sind in großer Anzahl leicht zu züchten und besitzen -- wie die Säugetiere -- ein gut ausgeprägtes Hormonsystem. Die Untersuchungen über die Insektenhormone wurden entscheidend gefördert durch die Isolierung und Kristallisierung des Hautungshormons Ecdyson (Butenandt und Karlson 1954)¹⁾. Außerdem zeigen manche Insekten in bestimmten Geweben Riesenchromosomen, welchen für entwicklungsphysiologische Fragen besondere Bedeutung zukommt.

Über die biochemische Wirkungsweise der Hormone wurden in letzter Zeit einige Vorstellungen entwickelt, die experimentell belegt sind (Zusammenfassungen von Karlson²⁾ und Tomkins et al.³⁾;

1. Hormone wirken aktivierend oder hemmend auf gewisse Enzymsysteme. So wird z.B. unter Adrenalin-Einfluß das zyklische Adenosin-3', 5'-monophosphat gebildet, das die für die Überführung von Glykogen in Glucose-1-phosphat wichtige Phosphorylase aktiviert.
2. Hormone wirken durch Verändern der Permeabilität von Membranen. Vom Vasopressin wird z.B. angenommen, daß durch Reaktion seiner Disulfidbrücke mit einem Proteinrezeptor eine Veränderung der Membrantertiärstruktur ausgelöst wird.

3. Hormone wirken durch Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene. Dieser zunächst für das Ecdyson erhobene Befund scheint für viele Steroidhormone verallgemeinerungsfähig zu sein.

Die exakte Beschreibung der biochemischen Wirkungsweise der Hormone ist ohne die Angabe des genauen Wirkortes nicht möglich. Zur Klärung des primären Angriffspunktes der Hormone verbinden sich die Methoden des Morphologen und Cytologen mit denen des Biochemikers, um Aussagen machen zu können, an welchen Zellstrukturen einerseits und in welche Reaktionskette auf Molekularebene andererseits Hormone eingreifen.

Von den drei erwähnten Hypothesen scheint vor allem die letzte uns der Lösung der Frage näher zu bringen, wo der eigentliche Wirkort von Steroidhormonen zu suchen ist. Clever und Karlsson haben festgestellt, daß bestimmte Genorte in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von Chironomus-Larven schon 30 Min. nach Injektion geringer Dosen Ecdyson eine deutliche morphologische Veränderung, das sog. Puffing (engl. to puff = blähen) zeigen ^{4,5)}. Es lag daher der Gedanke nahe, daß hier der Primäreffekt des Hormons vorliegt, d.h. daß diese Puffs die eigentlichen Wirkorte darstellen. Die Puffs entstehen durch eine weitgehende Entspiralisierung der normalerweise in den Chromomeren eng zusammengerollten Elementarfibrillen; lichtmikroskopisch zeigt sich dies in einer deutlichen Auflockerung des Chromatins. Beermann hat die Puffs als Zonen genetischer Aktivität erkannt und sie bestimmten entwicklungsphysiologischen Erscheinungen zugeordnet. ⁶⁾ Die genetische Aktivität ist nach den Befunden Pellings vorwiegend in einer gesteigerten Ribonucleinsäuresynthese begründet; ⁷⁾ die relative Größe der Puffs und die Bildungsrate der Ribonucleinsäure (RNS), vermutlich Matrizen-RNS, in diesen Puffs gelten daher als Maß für die Aktivität der Desoxyribonucleinsäure (DNS = Genorte). Die Puffs treten immer dann auf, wenn die Hämolymphe einen hohen Ecdysonspiegel aufweist, also kurz vor der Verpuppung; sie können auch durch künstliche Erhöhung des Spiegels nach Injektion des Hormons vorzeitig induziert werden. Ihr Aktivitätsgrad ist somit durch die Menge des injizierten Hormons beeinflussbar. ⁸⁾

Da an den Puffs eine erhöhte RNS-Synthese stattfindet und da die Matrizen-RNS-Synthese im Zellkern stets der Proteinbiosynthese vorangeht, die zur Bildung essentieller Enzyme an den Ribosomen im Zellplasma führt, hat Karlson die folgende Hypothese aufgestellt^{2,9)}: Das Ecdyson aktiviert als Induktor gewisse Genorte, indem es bestimmte Repressoren abfängt, welche die DNS beladen. Die betreffenden Genorte produzieren nun Matrizen-RNS; diese bringt die Proteinbiosynthese, vermutlichentwicklungsspezifischer Enzyme, in Gang. Über die Natur der Repressoren ist noch nichts Sicheres bekannt; möglicherweise besitzen die Nucleohistone Repressoreigenschaften, da Huang et al. nach Entfernung dieser Nucleoproteine von der DNS eine gesteigerte RNS-Synthese gefunden haben.¹⁰⁾ (vgl. Abb. 1)

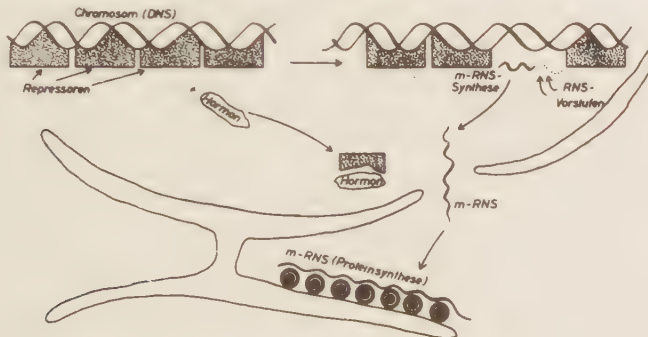


Abb. 1: Schema der Hormonwirkung nach Karlson.⁹⁾

Ecdyson stimuliert an bestimmten Genorten durch Reaktion mit Repressoren die Bildung von Matrizen-RNS, die ins Zellplasma wandert und an den Ribosomen die Proteinbiosynthese steuert.

Es wurde auch schon ein Enzym beschrieben, dessen Biosynthese durch Ecdyson in vivo induziert wird¹¹⁾: Die Dopadecarboxylase, der für die Insektenmetamorphose einige Bedeutung zukommt. Jedenfalls mehren sich in letzter Zeit die biochemischen Befunde, die in der Beeinflussung der chromosomalen RNS-Synthese und der dadurch eingeleiteten Proteinbiosynthese einen sehr frühen Effekt einiger Hormone wie Androgene¹²⁾, Östrogene¹³⁻¹⁵⁾, Thyroxin¹⁶⁾ und Insulin¹⁷⁾ erkennen lassen.

Ziel der Arbeit

Um die Frage zu prüfen, an welchen Zell- und Gewebestrukturen sich das Ecdyson anreichert und ob es dabei mit dem Zellkernmaterial selbst in Wechselwirkung tritt, sollte das Hormon mit einem geeigneten Radionuklid markiert und seine Lokalisation in den Zellen mittels biochemischer Methoden nachgewiesen werden.

Für die Markierung des Ecdysons kam nur Tritium in Frage, da die genaue chemische Konstitution des Hormons zur Zeit dieser Arbeit noch nicht ermittelt war. Das Radionuklid des Wasserstoffs läßt sich nämlich mit der von Wilzbach eingeführten Gasaustauschmethode bequem in komplizierte, ja sogar in strukturell noch nicht bekannte organische Moleküle einführen.^{18, 19)} Das Verfahren ist deshalb für die Markierung vieler organischer Verbindungen, die durch die üblichen Austauschreaktionen und chemische Synthesen nicht zu markieren sind, die Methode der Wahl. Tritium weist darüber hinaus eine Reihe von Vorteilen gegenüber den anderen, in der Biochemie verwandten Radionukliden auf. Erwähnt seien die hohen spezifischen Aktivitäten, die erhalten werden können, und die geringe Maximalenergie der β -Teilchen (18 keV); ihre Reichweite in Wasser und Gewebe beträgt höchstens 6 μ , in einer Filmemulsion nur 2 μ , was der autoradiographischen Nachweismethode ein hohes Auflösungsvermögen sichert. Allerdings benötigt die Autoradiographie sehr hohe spezifische Aktivitäten, die mit der Gasaustauschmethode nach Wilzbach meist nicht erreicht werden (durchschnittlicher Wert: 0,5 - 5 $\mu\text{Ci/mg}^{10}$). Für andere Methoden zum Nachweis von Radioaktivität genügen zwar geringere spezifische Aktivitäten; man wird sie jedoch in jedem Falle so hoch wählen, daß man mit physiologischen Dosen arbeiten kann.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit lag daher in der Gewinnung einer möglichst hohen spezifischen Aktivität des Hormons. Voraussetzung dafür waren eigene Erfahrungen und Kenntnisse über die günstigsten Reaktionsbedingungen der Wilzbach-Tritterung. Zu diesem Zwecke schienen eingehende Markierungsversuche mit weniger kostbaren Steroiden lohnend. Auf Grund der gewonnenen Erfahrungen wurden methodische Verbesserungen der Wilzbach-Technik

nik entwickelt und bei der Ecdyson-Tritierung angewandt. Diese Versuche bilden den Inhalt des ersten Teiles der Arbeit. Im zweiten Teil sollte die Verteilungsanalyse des markierten Hormons in Gewebe- und Zellfraktionen von Larven der Fliege *Calliphora erythrocephala* eine Beantwortung der Fragen ermöglichen: Wann ist die höchste Konzentration des Ecdysons im Erfolgsorgans erreicht? An welchen Zellbestandteilen des Erfolgsorgans reichert sich das Hormon innerhalb bestimmter Zeiten an? Welche Folgerungen ergeben sich daraus für die erwähnte Hypothese über die Wirkungsweise der Steroidhormone?

B) ALLGEMEINER TEIL

I. Markierung von Steroiden und von Ecdyson mit Tritium

1. Allgemeines

a) Methoden zur Tritiummarkierung

Tritium läßt sich in organische Verbindungen mittels folgender Methoden einführen²⁰⁾:

1. Austauschreaktionen unter dem Einfluß von Katalysatoren wie Säuren, Basen, Metallen oder Metallverbindungen.
2. Chemische Synthesen (meist Hydrierungen mit Edelmetallkatalysatoren).
3. Direktmarkierungen (Gasaustauschmethoden).
 - a) Normale Methode nach Wilzbach.
 - b) Markierung unter externer Energiezufuhr (UV-Licht, elektrische Entladungen, γ -Strahlen, Mikrowellen).
 - c) Kohle-Adsorptionsmethode.
4. Direktmarkierungen mit Rückstoßtritonien ($^6\text{Li}(n, \alpha)^3\text{H}$ oder $^3\text{He}(n, p)^3\text{H}$).

Da das Ecdyson gegen Säuren, Alkali und hohe Temperaturen instabil ist, kam von den angeführten Methoden zur Tritierung des Insekten-Metamorphosehormons nur die Direktmarkierung nach Wilzbach in Frage. Hierbei wird das Ausgangsmaterial in kristallisierter Form mit Tritiumgas in Kontakt gebracht; im Verlaufe längerer Zeit findet ein Austausch des im Molekül gebundenen Wasserstoffs gegen Tritium statt. Die Methode hat sich in chemisch-physikalischer Hinsicht noch als die schonendste erwiesen. Allerdings kommen neben dieser Austauschreaktion zahlreiche Umwandlungen und Zersetzungen vor (Additionen, Polymerisationen, Isomerisationen, Dehydrogenierungen, Dehydratisierungen usw.)¹⁹⁻²⁰⁾. Deshalb ist es bei solchen Versuchen stets notwendig, die markierten Verbindungen sorgfältig zu reinigen.^{19, 20)}

Der erhöhte Anteil an radioaktiven Nebenprodukten bei der Anwendung verschiedener Energiezufuhren²⁰⁾ ließ bei der geringen

zur Verfügung stehenden Menge des Hormons (5 mg) den Einsatz entsprechender Methoden zur Gewinnung hoher Tritiumaktivitäten wenig sinnvoll erscheinen.

Einen anderen Weg, um möglichst hohe spezifische Aktivitäten der gereinigten, stabil mit Tritium markierten Verbindungen ohne die erwähnten Nachteile anderer Methoden zu erreichen, hatten Wenzel et al. mit der Kohleadsorptionstechnik aufgezeigt.²³⁾ Die Autoren adsorbierten ihre Substanzen an Aktivkohle und erzielten so Vergrößerungsfaktoren der dem Tritiumgas ausgesetzten Substanzoberflächen bis zu 10^6 . Die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Produkte waren gegenüber den Kontrollversuchen um den Faktor 5-100 gesteigert. Die Steigerung war abhängig von der Adsorptionsdichte (Kohlebeladung): Geringere Kohlebeladungen bei gleicher Kohlemenge brachten höhere spezifische Aktivitäten bei gleichzeitiger Verminderung der Verunreinigungen. Wurden die Absorbate ferner bei -196°C tritiert, so wurde bei einigen Verbindungen neben einer weiteren Zunahme der spezifischen Aktivitäten ein deutlicher Rückgang der radioaktiven Nebenprodukte beobachtet.²⁴⁾ Die Autoren nehmen an, daß bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs der größte Teil des eingesetzten Tritiumgases von der Aktivkohle adsorbiert und durch Konzentrierung in den Kapillargängen und inneren Poren, in denen sich auch die zu markierende Substanz befindet, in erhöhtem Maße zum Austausch befähigt ist. Sie räumen jedoch ein, daß dieser positive Effekt mit der Verringerung der Austauschgeschwindigkeit bei tiefen Temperaturen konkurrieren wird.

b) Reaktionsbedingungen beim Tritium-Austausch nach Wilzbach-Wenzel

Für die optimalen Reaktionsbedingungen der Wilzbach-Wenzel-Methode kann man bis heute noch keine allgemeingültigen Richtlinien aufstellen. Abgesehen von der chemischen Konstitution einer Substanz (Zahl der Doppelbindungen, an denen Tritium addiert werden kann, Zahl der Hydroxylgruppen, die labiles Tritium aufnehmen können, Zahl der reaktiven, funktionellen Gruppen, die Zersetzungsreaktionen eingehen können) muß man bei der Wahl der

Bedingungen folgende Parameter beachten:

1. Aktivierungsgrad der Kohle
2. Adsorptionsdichte der zu markierenden Substanz
3. Curiemenge und Druck des Tritiumgases
4. Reaktionstemperatur
5. Reaktionszeit.

Da bislang nur wenige Arbeiten vorliegen, welche die Abhängigkeiten der einzelnen Parameter voneinander untersuchen²⁵⁾, konnten für die eigenen Markierungsversuche nur theoretische Überlegungen weiterhelfen. Danach war eine möglichst geringe Kohlebeladung zu fordern, um eine sehr dünne, im Idealfall monomolekulare Substanzschicht auf der Aktivkohle zu erreichen. Außerdem war nicht die zu tritierende Substanzmenge, sondern die Adsorbatmenge (Substanz + Kohle) als Bezugsgröße für die zu wählende Curiemenge anzusetzen. Man kann sich nämlich vorstellen, daß die Aktivkohle eine beachtliche Menge an Tritiumgas adsorbiert, welches dann zum gewünschten Austausch Wasserstoff gegen Tritium nicht verfügbar ist. Deshalb waren größere Curiemengen (> 10 C) empfehlenswert. Der Betrag an absorbiertem β -Zerfallsenergie pro Molekül sollte möglichst hoch sein (≥ 1 eV/Molekül), um hohe spezifische Aktivitäten zu erhalten¹⁹⁾. Da 1 Curie $^3\text{H}_2$ pro Stunde eine Zerfallsenergie von $7,6 \cdot 10^{17}$ eV liefert, wovon nur ein geringer Bruchteil absorbiert wird, waren mehr als 3 Wochen Expositionszeit ratsam.

Für die praktische Anwendung dieser Überlegungen wurden zunächst eigene methodische Voruntersuchungen notwendig, die im Abschnitt "Methodische Vorarbeiten" (S. 16) geschildert sind.

c) Reinigung tritierter Verbindungen

Man teilt die beim Wilzbach-Prozess ausgetauschten Tritiumatome hinsichtlich ihrer Stellungen und Auswaschbarkeit ein in:¹⁹⁾

1. labil gebundene Tritium-Atome an O, N, oder S (auswaschbar),
2. semilabil gebundene Tritium-Atome, z.B. an enolisierbaren Carbonylverbindungen und

3. stabil gebundene Tritium-Atome, die an C gebunden sind und nicht in Nachbarschaft zu aktivierenden Gruppen stehen.

Labiles Tritium läßt sich mit Lösungsmitteln auswaschen, die selbst beweglichen Wasserstoff besitzen, z.B. Wasser oder Methanol. Da es sich hierbei um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, muß die Substanz mehrmals aufgelöst und eingeengt werden. Semilabiles Tritium kann nur mit Alkali oder Säuren entfernt werden, worauf man wegen der folgenden Reinigungsschritte oft verzichten kann.

Wie sorgfältig Reinigungsoperationen der nach Wilzbach markierten Verbindungen durchgeführt werden müssen, zeigen Arbeiten von Florini²⁶⁾, Solomon et al.²⁷⁾, v. Holt et al.²⁸⁾, Jackson et al.²⁹⁾, Cameron et al.³⁰⁾, Schulze et al.³¹⁾ usw. Handelt es sich doch zumeist darum, gewichtsmäßig vernachlässigbare Verunreinigungen hoher spezifischer Aktivität (d.h. fast trägerfreie Nebenprodukte) von der eigentlich interessierenden Substanz abzutrennen.

Bei den geringen tritierten Substanzmengen (>20 mg) schienen von den in der präparativen organischen Chemie üblichen Trennmethoden nur die Chromatographie und die Gegenstromverteilung hinsichtlich der Trennschärfe aussichtsreich zu sein. Die Vor- und Nachteile beider Methoden speziell für diese Aufgabenstellung seien kurz umrissen:

Verfahren	Vorteile	Nachteile
Chromatographie	Gute Trennschärfe, geringer Arbeits- und Zeitaufwand	Sekundärreaktionen mit dem Träger, Isolierung der chromatographierten Substanz nötig
Gegenstromverteilung	Kein Substanzverlust	Geringere Trennschärfe, u.U. keine Trennung, großer Arbeits- und Zeitaufwand.

Die Abtrennung von Radioisomeren durch Gegenstromverteilung ist oft schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, da geeignete Trenngemische kaum bekannt sind und über 700 Verteilungsschritte nötig sein können.²⁶⁾

Mit Erfolg verwendet man deshalb für die radiochemische Reinigung von geringen Steroidmengen die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel oder an anderen Adsorbentien wie Aluminiumoxyd, Zellulose usw. Die Methode eignet sich vorzüglich für präparative Arbeiten im mg-Bereich.³¹⁾

d) Messung der Radioaktivitätsverteilung auf den Dünnschichtplatten

Die Trennungen können durch direkte Messung der Radioaktivitätsverteilung auf den Chromatogramplatten kontrolliert werden; hierzu hat sich das von Schulze et al. konstruierte Methanstrom-Zählrohr bewährt.³¹⁾ Die Platten liegen auf einem kleinen Wagen, der unter dem Zählrohr mit konstanter Geschwindigkeit weggezogen wird. Die Radioaktivität wird mittels eines Zählgerätes registriert und in Abhängigkeit vom R_f -Wert mit einem Schreiber aufgezeichnet.

2. Methodische Vorarbeiten

a) Wahl und Reinigung der Aktivkohle

Als Adsorbens für die Tritierungen wurde eine granuliert Aktivkohle gewählt, um das Aufwirbeln und Zerstäuben von Kohlenstaub beim Evakuieren der Tritierungsapparatur zu vermeiden.³²⁾

Bei der Vorextraktion verschiedener, unbeladener Kohlesorten mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Methanol, Benzol, Petroläther) war festgestellt worden, daß die Kohlen wechselnde Mengen an organischen Begleitsubstanzen adsorbiert hielten. Da weiterhin bekannt ist, daß manche Aktivkohlen mit Zinkchlorid aktiviert sind,³³⁾ wurde die für die Tritierungen vorgesehene Aktivkohle durch sorgfältiges Waschen mit Salzsäure, Wasser, Azeton und Benzol-Athanol von diesen Begleitstoffen befreit.

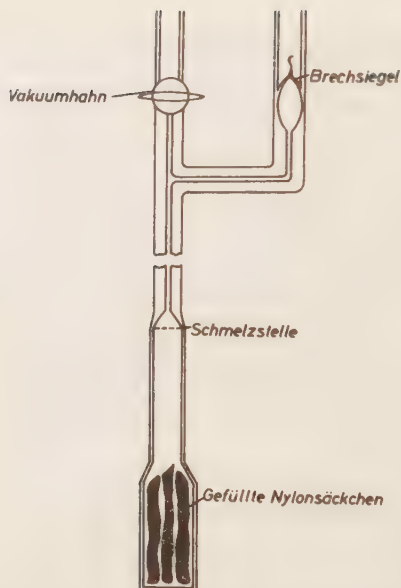
b) Elution der an Aktivkohle adsorbierten Substanzen

Die Vorteile der Kohle-Adsorptionsmethode waren für die Markierung des Ecdysons solange in Frage gestellt, als es nicht gelang, die in nur etwa 1% iger Dichte adsorbierte Menge wieder quantitativ zurückzugewinnen. Vorversuche mit Cortisol hatten gezeigt, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen Beladung und mit Methanol eluierbarer Substanzmenge bestand; sie ließen bei 1 % iger Dichte nur etwa 6 % der adsorbierten Menge wieder erwarten. Wenzel et al. hatten bei ihren Kohleversuchen Dichten zwischen 10 und 22 % gewählt und die Vorteile geringerer Beladungen (5 - 9 %) für die Erhöhung der spezifischen Aktivitäten zwar erkannt, sie jedoch mit Substanzverlusten von 42 - 74 % in Kauf genommen.^{24, 32)}

Es wurden deshalb zahlreiche Extraktionsversuche unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. In dem azeotropischen Gemisch Benzol-Äthanol wurde schließlich ein Elutionsmittel gefunden, das bei Extraktion im Mikrosoxhlet durchschnittlich 96 % des auf der Aktivkohle zu 1,22 % adsorbierten Cortisols wiedergewinnen ließ. Auch mit Ecdyson und anderen Steroiden wurden sehr befriedigende Ausbeuten erreicht (vgl. Tab. 3, 7, 8, 10). Das Gemisch ist wohl deshalb so vorteilhaft, weil sich Benzol bevorzugt an die freien Valenzen im Graphitgitter anlagert und adsorbierte Substanzen verdrängt, die im polaren Äthanol gut löslich sind. Damit wurde ein wesentlicher Einwand, den Chadha et al. gegen die Adsorptionstechnik erhoben haben,³⁴⁾ entkräftet.

c) Exposition der Adsorbate und Reaktionsgefäße

Besonders günstig erwies es sich, die beladene Kohle in Beuteln aus Nylongewebe einzuschließen und in einer Ampulle dem Gas auszusetzen. Durch diese vorteilhaften geometrischen Verhältnisse wurde die Diffusion des Gases wesentlich erleichtert. Ferner konnten mehrere Proben gleichzeitig in einer Ampulle exponiert werden. Die Reaktionsgefäße mußten so dimensioniert sein, daß etwa 30 Curie $^3\text{H}_2$ ($1 \text{ C } ^3\text{H}_2 = 0,38 \text{ ml}$) und etwa 2 g Kohlead-sorbat gut unterzubringen waren; der Gasdruck sollte aber



500 mm Hg nicht unterschreiten, so daß dem Gefäßvolumen Grenzen gesetzt waren. Eine entsprechend entworfene Reaktionsampulle wurde diesen Anforderungen gerecht (Abb. 2).

Abb. 2: Reaktionsampulle für Wilzbach-Tritierungen.

d) Erfahrungen mit der präparativen Dünnschichtchromatographie

Im Verlaufe der Arbeit traten einige Eigenschaften der präparativen Dünnschichtchromatographie in Erscheinung, die besondere Beachtung hinsichtlich des Trennerfolgs verdienten. Abgesehen davon, daß auf die Einhaltung konstanter Chromatographiebedingungen wie

- konstanter Aktivierungsgrad des Kieselgels,
- konstante Kieselgel-Schichtdicke und
- homogene Sättigung der Trennkammer mit dem Laufmittelgemisch

besonders geachtet werden mußte, wurde die Wahl des optimalen Verhältniswertes der zu chromatographierenden Substanzmenge zur Schichtdicke als wichtig erkannt. Dieser Wert hängt von der Polarität einer Substanz ab; mit zunehmender Polarität wird er kleiner. Für das mäßig polare Digitogenin wurde z.B. gefunden, daß 20 mg des Sapogenins einen genügend scharfen R_f -Wert auf einer 0,6 mm dicken Kieselgelschicht der Maße 20 x 20 cm ergaben, während 5 mg des hochpolaren Ecdysons auf einer gleichen Schicht eine breite Zone zwischen den R_f -Werten 0,2 und 0,4 lieferten.

Ferner kam dem Reinheitsgrad des Kieselgels große Bedeutung zu. Das gebräuchliche Kieselgel G Merck ließ sich auch nach 8-stündiger Extraktion im Soxhlet mittels Methanol nicht vollkommen von organischen Bindemitteln, Calciumsulfat und löslicher Kieselsäure befreien. Durchschnittlich wurden nach dieser Vorreinigung noch 2 mg Rückstand pro g Kieselgel G erhalten, was sich bei den geringen chromatographierten Substanzmengen (2 - 20 mg) störend bemerkbar machte. Die von Handerath zitierten Angaben, wonach zur Gewinnung reiner Substanzen die Vorextraktion des Kieselgels mit Methanol völlig ausreichen würde,²⁹⁾ konnten somit nicht bestätigt werden. Die eigenen Verbindungen wurden nach der Reinigung aus Lösungsmitteln wie Essigester und Chloroform umkristallisiert, in denen die Begleitsubstanzen des Kieselgels unlöslich waren. Das im Verlaufe der Arbeit neu eingeführte Kieselgel H Merck (ohne Silica und andere Bindemittel) wurde aus diesen Gründen bei den beiden letzten Adyson- und Digitogenin-Versuchen bevorzugt.

e) Laufmittelgemische für die Dünnschicht- und Papierchromatographie

Nach zahlreichen Vorversuchen erwiesen sich die in Tab. 1 und 2 aufgeführten Laufmittelsysteme als am besten geeignet. Wie man sieht, gelang die Trennung auch chemisch sehr ähnlicher Steroide (Δ^5 -Pregnandiol-(17 α .21)-trion(3.11.20)-21-acetat und Δ^1 - Δ^5 -Pregnandiol-(17 α .21)-trion(3.11.20)-21-acetat, Digitogenin und Gitogenin).

f) Quantitative Aufarbeitung der Dünnschichtchromatogramme

Um die chromatographierten Substanzen möglichst quantitativ vom Kieselgel zurückzugewinnen, mußten geeignete Extraktionsbedingungen gefunden werden. Da hierüber nur wenige Arbeiten vorliegen,³⁶⁾ wurden eigene Versuche unternommen. So wurden nach Chromatographie von 157,2 μ g Cortisol auf einer 0,4 mm dicken Kieselgel H₆₀ 254-Schicht und 3-maliger je 2 Min. langer Extraktion mittels Methanol, Magnetrührer und Filtration über eine G 4-Fritte 79,1 % (σrel. = $\pm$ 1,2 %), bei 3-maliger je 3 Min. langer Extraktion 86,6 % (σrel. = $\pm$ 0,3 %) wiedergefunden; die

Substanz	1. Chromatogramm Gemisch V/V R _f	2. Chromatogramm Gemisch V/V R _f	3. Chromatogramm Gemisch V/V R _f
5 α -Pregnandiol- (17 α ,21)-trion- (3.11.20)-21- acetat	Cyclohexan 30 Chloroform 70 0,53 Diäthylamin 10	Cyclohexan 30 Chloroform 70 0,52 Pyridin 7	Cyclohexan 30 Chloroform 70 0,52 Methanol 10
Δ^1 -5 α -Pregnen- diol-(17 α ,21)- trion-(3.11.20)- 21-acetat	Cyclohexan 30 Chloroform 70 0,45 Diäthylamin 10	Cyclohexan 30 Chloroform 70 0,48 Pyridin 7	Cyclohexan 30 Chloroform 70 0,46 Methanol 10
Ecdyson Versuch Nr. 1	Benzol 100 0,23 Propanol 35 0,43	Benzol 100 Propanol 35 0,33	Chloroform 90 Propanol 50 0,30
Ecdyson Versuch Nr. 2	Chloroform 100 0,20 Propanol 60 0,40	Chloroform 50 0,17 Propanol 30 0,37	Toluol 80 Butanol 30 0,77 Wasser 50 (Papierchromatog.)
Ecdyson Versuch Nr. 3	Methylen- chlorid 80 0,31 Aceton 20 bis Äthanol 25 0,49	Methylen- chlorid 70 0,26 Aceton 30 bis Äthanol 20 0,40	Toluol 80 Butanol 25 0,79 Wasser 50 (Papierchromatog.)
Digitogenin	Cyclohexan 50 0,65 Aceton 50	Cyclohexan 50 0,58 Aceton 50	Cyclohexan 50 0,63 Aceton 50 Methylen- chlorid 80 0,77 Aceton 20

Tab. 1: Laufmittelgemische für die Dünnschichtchromatographie (Ausnahmen sind gekennzeichnet.)

Substanz	System Gemisch	V/V	R _f	Bemerkungen
Ecdyson	a Butanol- gesättigtes Wasser		0,67	Kammersätti- gung 12 Stdn.
	b Toluol	80	0,78	Kammersättigung mit der Unterphase 12 Stdn.
	Butanol Wasser	25 50		
Digitogenin	a Toluol	40	0,77	Kammersättigung mit der Unterphase 12 Stdn.
	Äthanol	4		
	Wasser	9		
	b Formamid/ Benzol		0,60	Imprägnierung mit Formamid, Benzol mo- bil

Tab. 2: Laufmittelgemische für die Papierchromatographie.

Werte resultieren aus je 8 Einzelbestimmungen.* Für Steroide ist außerdem wichtig, daß das Chromatogramm sofort nach dem Auftragen der Substanzen entwickelt und danach sogleich extrahiert wird. Anderenfalls kann man eine irreversible Adsorption der Steroide an Kieselgel feststellen, ein Verhalten, welches man bisher nur bei dieser Substanzklasse findet.³⁷⁾ Die erwähnte Extraktionsmethode (mit Magnetrührer rühren und durch feinporige Fritte absaugen) erschien insofern vorteilhaft, als weniger Verunreinigungen aus dem Sorptionsmittel mitextrahiert werden. Bei größeren zu extrahierenden Substanzmengen (> 3 mg/Platte) war jedoch die Soxhlet-extraktion vorzuziehen, da sie eine kontinuierliche und erschöpfendere Elution gestattete.

$$* \sigma_{\text{rel.}} = \frac{\sigma \cdot 100}{\text{MW}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(f)^2}{N-1}}$$

σ = Standardabweichung
 f = Abweichungen der Einzel-
messung vom Mittelwert
MW = Mittelwert
N = Anzahl der Messungen

3. Markierungsversuche

a) Tritierung von Modellsteroiden nach der Kohle-Adsorptions-Methode

Da das Ecdyson (Summenformel $C_{27}H_{44}O_6$) nach neueren Befunden zu den Steroiden gehört,³⁸⁾ war es naheliegend, für das Auffinden der besten Tritierungsbedingungen Polyhydroxy-Steroide als Modellsubstanzen heranzuziehen. Die gewonnenen methodischen Erfahrungen sollten späteren Ecdyson-Markierungen zugutekommen. Als Vergleichssubstanzen wurden die sehr polaren Steroide

Δ^1 -5 α -Pregnendiol-(17 α ,21)-trion-(3.11.20)-21-acetat und
5 α -Pregnandiol-(17 α ,21)-trion-(3.11.20)-21-acetat ge-

wählt. Die beiden Modellsteroiden wurden an Aktivkohle adsorbiert und 29 Tage lang mit Tritium behandelt (Gesamtmenge 33 C, Isotopenreinheit des Gases zu Beginn: 98 % 3H_2). Als Reaktionstemperatur schien eine möglichst tiefe Temperatur (bei flüssigem Stickstoff: $-196^\circ C$) Vorteile zu bieten. Es wurden jedoch Parallelversuche bei Raumtemperatur gleichzeitig angesetzt, um diesen Punkt nochmals zu überprüfen. Die übrigen Reaktionsbedingungen sind aus Tab. 3 ersichtlich. Von den 33 C Tritiumgas wurden 23 bzw. 22 C zurückgewonnen; im Falle des Tieftemperaturversuches betrug die Isotopenreinheit 96,3 % 3H_2 nach der Tritierung, was nach Auskunft von Dr. E.A. Evans, Amersham, England, auf eine bevorzugte Addition hinwies. Im Falle des Raumtemperaturversuches betrug sie 82,8 % 3H_2 , was vermutlich auf mehr Substitution als Addition zurückzuführen war.

In Tab. 4 sind die Ausbeuten an Rohprodukten, die bei den verschiedenen Bedingungen erhalten wurden zusammengestellt. Im Falle des gesättigten Modellsteroids war die nach der Adsorbatmethode (Versuch 2) erhaltene spezifische Aktivität größer als im Parallelversuch ohne Träger (Versuch 1). Beim Pregnenderivat (Versuch 5) war sie geringer, vermutlich weil bei der trägerfreien Tritierung viel Additionsprodukt hoher Aktivität entstand. In Abb. 2 sind die Radio-Dünnschichtchromatogramme der Rohprodukte von Versuch 1 und 2 gegenübergestellt. Man erkennt, daß bei der Kohle-Adsorbat-Tritierung der Gipfel des Hauptproduktes viel

Substanz	Ver- such Nr.	Tritie- rungs- methode	Temperatur der Tritie- rung(°C)	Adsorp- tions- dichte (Gew.%)	Eingesetzte Substanz- menge (mg)	Eluierte Substanz- menge (mg) grav.	spektrom.
5 α -Pregnan- diol-(17 α .21)-trion- (3.11.20)-21- acetat	1	Normal	+ 20	-	11,1	10,8	-
	2	Kohle	+ 20	1,35	11,3	10,8	-
	3	Kohle	- 196	1,35	13,0	13,1	-
Δ^1 -5 α -Pregnen- diol-(17 α .21)- trion-(3.11.20)- 21-acetat	4	Normal	+ 20	-	11,5	11,7	11,4
	5	Kohle	+ 20	1,46	14,0	10,3	9,7
	6	Kohle	- 196	1,46	14,4	15,6	14,2

Tab. 3: Isolierung der ungereinigten Modellsteroidoide

Ver- such Nr.	Spezifische Aktivität des Rohprod. (µC/mg)*	1. Chromatogramm		2. Chromatogramm		3. Chromatogramm		Aus- beute (mg)
		Nebenprodukte in % d.aufgetr. Aktivität	Spez. Akt. d. Haupt- fraktion (µC/mg)	Nebenprodukte in % d.aufgetrag. Aktiv.	Spez. Akt. d. Haupt- fraktion (µC/mg)	Nebenprod. in % d.auf- getr. Aktiv.	Spez. Akt. d. Haupt- fraktion (µC/mg)	
1	2330	90	220	81	47,1	2	45,8	2,7
2	3830	72	431	17	156	14	252	2,1
3	-	66	9,8	25	3,6	-	-	-
4	2100	92	162	78	47,4	13	44,1	3,4
5	1230	78	225	25	169	6	161	2,5
6	91,8	89	5,35	58	1,96	9	1,92	3,6

Tab. 4: Reinigung der tritiierten Modellsteroidoide (* von labilem ^3H befreit)

stärker in Erscheinung tritt als bei der trägerfreien Tritierung.

Entgegen der Erwartung waren bei der Tieftemperatur-Tritierung die erhaltenen spezifischen Aktivitäten sehr viel geringer als bei Raumtemperatur. Dies wird in der stark verminderten Austauschgeschwindigkeit begründet sein. Vielleicht ist der Unterschied auch in der Natur der Substanz zu suchen; Wollenberg et al. fanden, daß z.B. Tyrosin nur schlecht in der Kälte tritiert werden kann.²⁴⁾

Da weniger Nebenprodukte entstanden, wurde auch die Reinigung durch Dünnschichtchromatographie einfacher. Die Radioaktivität wurde direkt auf den Platten gemessen (vgl. S.16). Beispiele für derartige Aktivitätsverteilungen auf den Platten bieten die Abb. 3, 4 und 5. Wie die Abb. 3 und 5 zeigen, blieb der Hauptteil der radioaktiven Verunreinigungen in der Nähe der Startlinie hängen. Durch mehrmalige Rechromatographie der an den gewünschten Maxima abgeschabten und eluierten Verbindungen konnten radiochemisch reine Produkte mit den richtigen R_f -Werten erhalten werden. Die Maxima wurden durch Anfärbung am Rande der Platten identifiziert.

Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tab. 4 zusammengestellt. Mit der Entfernung der sehr hoch markierten Umwandlungsprodukte nimmt die spezifische Aktivität jeder Hauptfraktion ab. Eine konstante spezifische Aktivität dürfte nach der dritten Chromatographie erreicht sein, denn die Mengen an Nebenprodukten, die in diesem letzten Schritt abgetrennt wurden, waren mit 2 - 14 % viel geringer als bei den beiden ersten Chromatographien, und die Eluate aus der dritten Chromatographie erwiesen sich einheitlich und radiochemisch rein, wie die in Abb.4 wiedergegebene Aktivitätsverteilung auf der Platte zeigt. Bei diesem Versuch handelte es sich um die trägerfreie Tritierung des Pregnanderivates, bei der der Anteil der Verunreinigungen besonders hoch war. Die fortschreitende Reinigung sowie der "Schutzeffekt" der Kohle werden besonders deutlich, wenn man die Zahlen der Tab. 4 sowie die Abb. 5a bis c mit d bis f vergleicht.

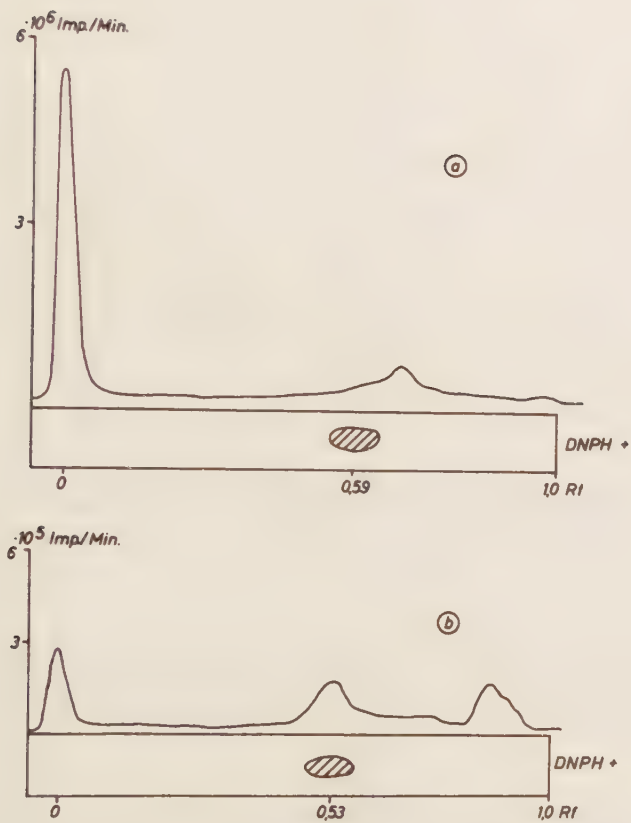


Abb. 3: Radio-Dünnschichtchromatogramme der bei $+ 20^{\circ}C$ tritiierten Pregnanderivate.

a) Kontrollsubstanz (normale Wilzbach-Technik)

b) Kohleadsorbat

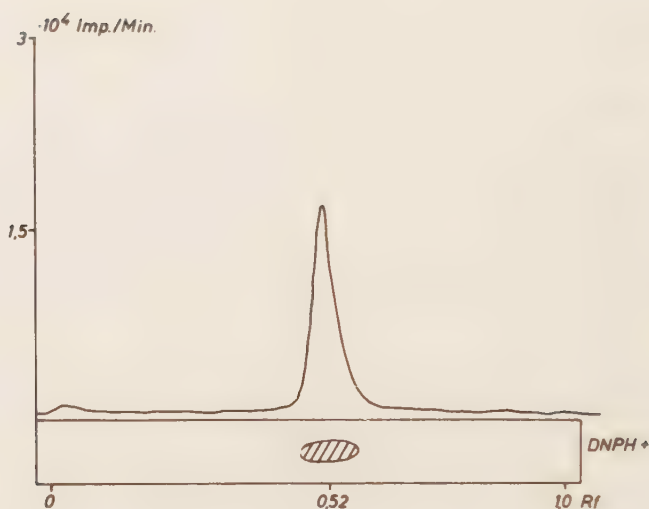


Abb. 4: Radio-Dünnschichtchromatogramm des bei $+ 20^\circ\text{C}$ nach Wilzbach tritierten Pregnanderivates nach der 3. Reinigung.

Damit ist gezeigt, daß die hier angewandte Reinigungsmethode schnell und schonend zu radiochemisch einheitlichen Produkten führt und für die Reinigung kleinster Mengen besonders geeignet ist.

Die Vorteile der Kohle-Adsorptionsmethode sind aus Tab. 5 ersichtlich. Bei den Raumtemperaturversuchen konnten demnach 3 - 5-fach höhere spezifische Aktivitäten erzielt werden; der "Schutzeffekt" der Kohle gibt sich in den Zahlen der letzten Spalte der Tab. 5 zu erkennen.

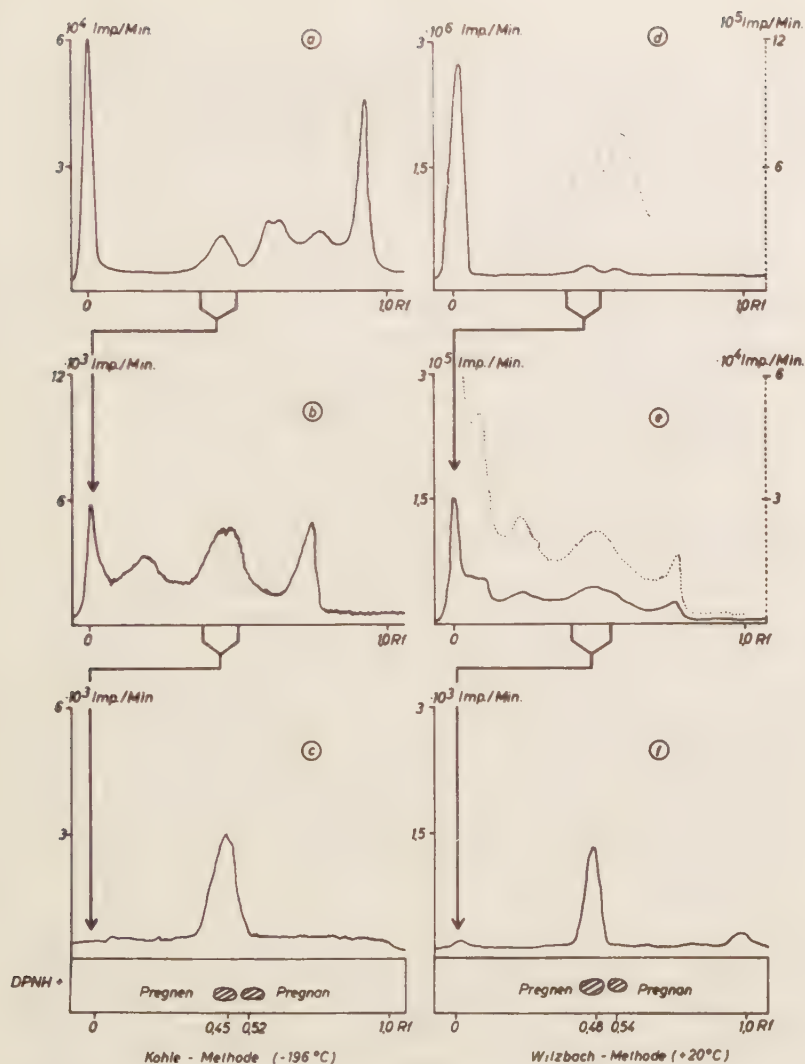


Abb. 5: Radio-Dünnschichtchromatogramme des Pregnenderivates:
a) - c) : 1.-3. Reinigungsschritt des bei -196°C tri-
tierten Kohleabsorbates
d) - f) : 1.-3. Reinigungsschritt des bei $+20^\circ\text{C}$ tri-
tierten Wilzbach-Präparates.

Ver- such Nr.	Tritierungsbe- dingungen (°C)	Faktor	Erhaltene Aktivität des Rein- produktes in % der des ein- gesetzten Rohproduktes
1	Normal + 20	1	1,9
2	Kohle + 20	5,5	6,6
4	Normal + 20	1	2,1
5	Kohle + 20	3,6	13,1
6	Kohle -196	0,04	2,1

Tab. 5: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der gereinig-
ten Modellsteroidoide.

b) Tritierung des Ecdysons nach der Kohle-Methode

Die Vorteile der Kohle-Adsorptionsmethode gegenüber der norma-
len Wilzbach-Technik waren nach den vorstehenden Befunden of-
fensichtlich. Deshalb wurden nach dieser Methode zwei Versuche
mit Ecdyson unternommen. Da das Ecdyson ein α,β -ungesättigtes
Keton ist und Hydrierungen konjugierter Doppelbindungen von
Steroidketonen bekannt sind, bestand die Möglichkeit der Tri-
tiumaddition beim Wilzbach-Prozess; Hoffmeister fand aber, daß
sich das Hormon unter milden Bedingungen, d.h. ohne Säurezusatz,
nicht hydrieren läßt,³⁸⁾ weshalb die Wilzbach-Tritierung aus-
sichtsreich erschien.

Die Tritierungsbedingungen sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Versuch	Adsorptions- dichte (Gew.%)	Temp. (°C)	Tritium- menge (C ³ H ₂)	Gasdruck (mm Hg)	Reaktionszeit (Tage)
1	0,770	-196	33	600	29
2	0,585	+ 20	40	600	43

Tab. 6: Reaktionsbedingungen der Ecdyson-Tritierungen.

Die Proben wurden in analoger Weise aufgearbeitet. Tab. 7 zeigt die Isolierung und Reinigung der Rohprodukte. Das von der Kohle eluierte Ecdyson (Versuch 2) wies trotz der langen Reaktionszeit das typische UV-Spektrum des unmarkierten Hormons auf; ein Zeichen dafür, daß zumindest 88% der eingesetzten Menge nicht durch Tritiumaddition an die Doppelbindung markiert worden sind, da von 4,85 mg eingesetzter Substanz 4,27 mg nach Tritierung und Elution spektrometrisch nachgewiesen wurden. Die Chromatographiebedingungen und Laufmittel sind in Tab. 1 und 2 aufgeführt. Zur schärferen Abtrennung der vielen Nebenprodukte wurde bei Versuch 2 der dritte Reinigungsschritt auf dem Papier präparativ durchgeführt (7 µg Ecdyson/cm Startlinie). Absolute Kammersättigung war bei allen Chromatographien erforderlich.

Abb. 6 bietet einen Vergleich zwischen den beiden ersten Radiochromatogrammen der beiden Versuche. Wie man sieht, sind beim Tieftemperaturversuch 23 %, beim Raumtemperaturversuch nur 4 % der aufgetragenen Aktivitäten der Hauptfraktion zuzuordnen. Der hohe Anteil der Nebenprodukte an der Aktivität des Versuches 2 dürfte nicht nur der Reaktionstemperatur, sondern auch der verlängerten Reaktionszeit zuzuschreiben sein.

Bei der Radio-Papierchromatographie der Hauptfraktion der letzten Dünnschicht-Reinigung zeigte Versuch 1 im System a (vgl. Tab. 2) ein einheitliches Maximum und beim biologischen Test an Calliphora seine volle hormonale Wirksamkeit. Ausbeute: 0,87 mg Ecdyson-³H der spezifischen Aktivität 2,75 µC/mg.

Die fortschreitende Reinigung wird in Abb. 7 am Beispiel des Versuches 2 veranschaulicht. Beim dritten Reinigungsschritt auf dem Papier konnten noch über 70 % der aufgetragenen Verunreinigungen abgetrennt werden. Danach ließ ein weiteres Papierchromatogramm noch etwa 12% Nebenprodukte erkennen; die Hauptfraktion hiervon erwies sich schließlich als rein und zeigte im Calliphora-Test ihre volle biologische Aktivität. Ausbeute: 0,91 mg Ecdyson-³H der spezifischen Aktivität 6,64 µC/mg.

Versuch Nr.	Winge- setzte Substanz- menge (mg)	Eluierte Sub- stanzmenge (mg)	Spez. Aktiv. des Rob- prod. ** ($\mu\text{C}/\text{mg}$)	1. Chromatogramm Nebenpro- dukte in % der auf- getragenen Aktivität	2. Chromatogramm Neben- produk- te in % der auf- getragenen Aktiv.	3. Chromatogramm Neben- produk- te in % der auf- getragenen Aktiv.	Spez. Aktiv. der Haupt- frakt. ($\mu\text{C}/\text{mg}$)
1	5,01	5,75	56,1	77	29	12	2,75
2	4,85	6,10	2724	96	42	71	7,37

Tab. 7: Isolierung und Reinigung der tritiierten Ecdyson-Proben
(*von labilem ^3H befreit)

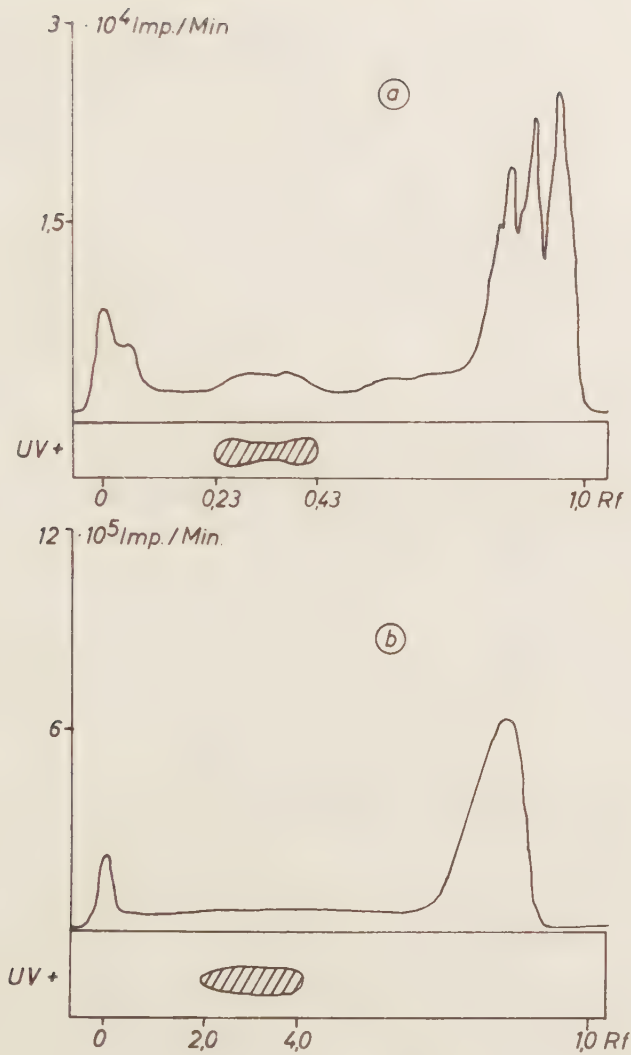


Abb. 6: Radio-Dünnschicht-
chromatogramme der tri-
tierten Ecdyson-Rohpro-
dukte

a) : Versuch 1

b) : Versuch 2

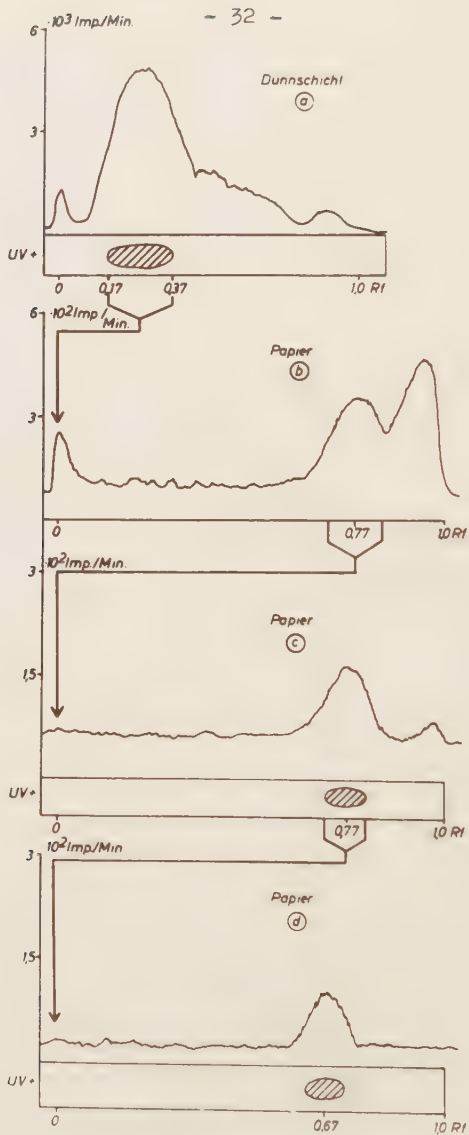


Abb. 7: Reinigung des Ecdyson-Versuches 2

- a) - c) : 2.-4. Reinigungsschritt
 d) : Reinprodukt (im System a, vgl. Tab. 2)

Damit war in beiden Versuchen eine hohe radiochemische Reinheit erreicht. Zur Frage der papierchromatographischen Nachweisempfindlichkeit von Nebenprodukten sei auf eine Arbeit von Simon hingewiesen,³⁹⁾ in der gezeigt wurde, "daß die papierchromatographische Reinigung wesentlich wirksamer als Umkristallisation und Derivatbildung ist."

Über die Natur der Zersetzungsprodukte konnte nach Elution im UV-Spektrum nichts Näheres ermittelt werden. Sie zeigten ein stark apolares Verhalten bei der Dünnschichtchromatographie mit Chloroform und Cyclohexan.

Daß das Ecdyson bei Versuch 2 trotz der extremen Reaktionsbedingungen nicht wesentlich mehr Tritium als bei Versuch 1 aufnahm, ist sicherlich auch im hydrophilen Charakter des Hormons begründet. Die lange Reaktionszeit von 6 Wochen begünstigte zweifellos das Anwachsen der radioaktiven Nebenprodukte. Trotzdem wird auch hier der Vorteil der Kohle-Adsorptionsmethode offenkundig, wenn man die in der Literatur angegebenen spezifischen Aktivitäten mit den erhaltenen vergleicht (vgl. Tab. 10). Die Ergebnisse zeigen immerhin, daß sowohl die Tritierungs- als auch die beschriebene Reinigungsmethode schonend genug sind, um das empfindliche Hormon markiert, aber unzerstört zu erhalten.

c) Tritierung von Digitogenin nach der Platin-Kohle-Methode

Die mit der Kohle-Adsorptionsmethode erzielten spezifischen Aktivitäten des Ecdysons reichten zwar aus, um eine Verteilungsanalyse des Hormons in Calliphora-Larven durchzuführen, waren aber für andere biochemische und autoradiographische Versuche bei weitem noch nicht hoch genug. Die möglichen methodischen Verbesserungen, mit denen man höhere spezifische Aktivitäten der nach Wilzbach markierten Substanzen erhalten kann, sind schon kurz umrissen worden (vgl. S. 12). Sie alle boten für das gesteckte Ziel keine Vorteile.

Auf eine neue Möglichkeit, die spezifischen Aktivitäten zu steigern, wiesen Meshi et al. 1962 hin.⁴⁰⁾ Die Autoren vermischten ihre Substanzen mit gleichen Mengen (100 mg + 100 mg) der Edel-

metallkatalysatoren Palladium- bzw. Platinmohr und behandelten sie mit je 100 mC Tritium 4 - 22 Tage lang. Während dieses Verfahrens bei aromatischen Verbindungen wie Benzoesäure und Salicylsäure zu Steigerungen um den Faktor 200 - 3900 führte, konnten aliphatische Verbindungen wie Valin, Inosit und Prednisolon nur um das 2 - 29-fache höher markiert werden.

Es lag daher der Gedanke nahe, durch Kombination des Platin-katalysierten Austauschverfahrens mit der Kohle-Adsorptionsmethode gerade auch bei Aliphaten noch höhere spezifische Aktivitäten zu erzielen. Durch Adsorption und somit Oberflächenvergrößerung der zu markierenden Substanz auf der Platin-beladenen Aktivkohle sollte ein nahezu idealer Kontakt zwischen Substanz, Austauschkatalysator Platin und Tritium ermöglicht werden. Höhere spezifische Aktivitäten der gereinigten Produkte, kürzere Reaktionszeiten und weniger Nebenprodukte waren als Vorteile gegenüber allen anderen Modifikationen der Wilzbach-Technik zu erhoffen.

Als Modellsteroid zur Erprobung der Methode wurde Digitogenin gewählt, da dieses Sapogenin gewisse Eigenschaften mit dem Ecdyson teilt (Steroid der Summenformel $C_{27}H_{44}O_5$, 3 Hydroxylgruppen, eine Glykolgruppe, die im Versuch z.B. dehydratisiert werden kann).

Das Digitogenin wurde durch 4-stündige Hydrolyse von Digitonin "Schering" in 4 n-HCl dargestellt⁴¹⁾ und aus Methanol umkristallisiert (Schmp. $259^{\circ}C$). Es wies dünnschichtchromatographisch 2 andere Sapogenine (darunter Gitogenin) auf, die üblicherweise derartige Hydrolyseprodukte verunreinigen. Da sie sich durch die folgenden Reinigungsschritte zusammen mit den radiochemischen Nebenprodukten abtrennen lassen, wurde das Rohprodukt eingesetzt. Als Träger für die Tritierung wurde gereinigte und feinkörnige Aktivkohle verwendet, die durch Fällung von $H_2PtCl_6 \cdot 6 H_2O$ mittels gereinigtem Wasserstoff mit 10 % Platinmohr beladen war. Eine 6 % ige Adsorptionsdichte des Digitogenins auf der so präparierten Aktivkohle schien vorteilhaft.

Die Adsorbate (je 375 mg) bzw. die Rohsubstanz (10,8 mg) wurden, wie beschrieben (vgl. S. 17 und 61), in Nytonsäckchen eingeschlossen und -- jede einzelne Probe für sich allein -- 7,5 Stdn. mit je 2 Curie Tritium in einer Apparatur nach Wenzel et al.⁴²⁾ behandelt. Das mit Benzol-Athanol eluierte Digitogenin wurde in üblicher weise dünnschichtchromatographisch aufgearbeitet. Die Isolierung und Reinigung der Proben zeigt Tab. 8. Jeweils nach dem dritten Reinigungsschritt erwiesen sie sich papier- und dünnschichtchromatographisch in je 2 verschiedenen Systemen rein. Die Analysendaten des erhaltenen Digitogenins-³H (Schmp. 285°C, IR- und UV-Spektrum, letzteres vom Schwefelsäure-Chromogen vgl. S. 61, Papier- und Dünnschichtchromatographie) waren identisch mit denen von reinem Digitogenin, wobei die Isomere 25- α und 25- β nicht getrennt sind. Die Ausbeuten betrugen 9 - 17 % des eingesetzten Roh-Digitogenins, was Ausbeuten von etwa 18 - 34 % an reinem Digitogenin entsprach (vgl. Tab. 8).

Tab. 9 zeigt die Steigerungen der spezifischen Aktivitäten, die mit den verschiedenen Methoden erzielt wurden. Abb. 8 bietet einen Vergleich der Methoden an Hand der einzelnen Reinigungsschritte. Vergleicht man hierbei die maximalen Ordinatenwerte der Radiochromatogramme b und f, so kann man den Steigerungsfaktor von etwa 100 unmittelbar ablesen. Die Versuche zeigten bei allen Abwandlungen der Wilzbach-Methode erhöhte Ausbeuten. Platin- beschickte Kohle ergab beinahe 100-fach höhere spezifische Aktivitäten als ein nach Wilzbach markiertes Präparat und 3-fach höhere als ein reines Kohle-Adsorbat. Die Anwendung tiefer Temperaturen schien auch bei den Platin-Kohleadsorbaten nicht vorteilhaft zu sein. Bei den Adsorbatversuchen war das Ausmaß an radioaktiven Nebenprodukten um das 5 - 17-fache geringer; die Hauptmengen blieben bei der ersten Chromatographie am Start hängen. Bemerkenswerterweise stiegen mit der Erhöhung der spezifischen Aktivitäten der Reinprodukte auch die Nebenprodukte an. Dies war dem Katalyseeffekt des Platins zuzuschreiben, der nicht nur den zum tritierten Reinprodukt führenden Austausch, sondern auch die zu markierten Nebenprodukte führenden Reaktionen beschleunigte. Die für die übliche Wilzbach-Methode sehr kurze Reaktionszeit von 7,5 Stdn. schien das Anwachsen der Nebenprodukte zu verhindern.

Tritierungs- methode	Tempe- ratur (°C)	Tritium- gasdruck (mm Hg)	Einge- setzte Sub- stanz- menge (mg)	Eluierte Substanz- menge(mg)	Spezif. Aktiv. d. Roh- prod. * (µC/mg)	Spezifische Aktivitäten(µC/mg) nach dem Reinigungsschritt		Ausbeute (mg)
						Nr. 1	Nr. 2	
Wilzbach	+ 20	156	19,8	19,8	2,44	0,18	0,12	2,3
Pt-Kohle	+ 20	135	22,6	19,0	43,0	11,58	8,75	1,9
Pt-Kohle	-196	< 1 bei -196°C	22,6	21,8	13,15	3,13	2,31	3,0
Kohle	+ 20	166	21,4	21,0	3,75	2,56	2,31	3,7

Tab. 8: Isolierung und Reinigung der tritierten Digitogenin-Proben (* von labilem ³H befreit)

Tritierungsbedingungen (°C)	Faktor der Erhöhung der spezifischen Aktivitäten Rohprodukt	nach dem Reinigungsschritt			Erhaltene Aktivität des Reinformproduktes in % der des eingesetzten Rohproduktes
		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	
Wilzbach	+ 20	1	1	1	3
Pt-Kohle	+ 20	17,6	64,3	91,5	15,3
Pt-Kohle	-196	5,4	17,4	33,9	18,5
Kohle	+ 20	1,5	14,2	27,3	52,5

Tab. 9: Vergleich der nach verschiedenen Methoden tritierten Digitogenin-Proben

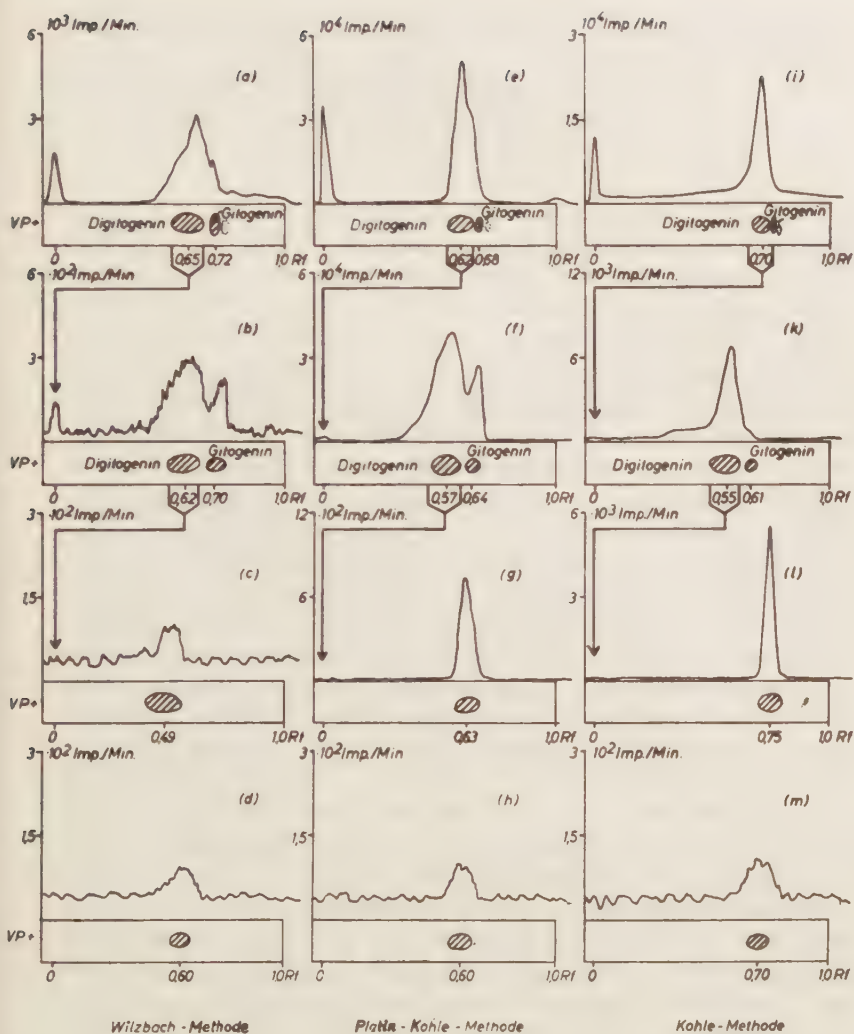


Abb. 8: Radio-Dünnschicht- bzw. Papierchromatogramme der bei + 20°C tritiierten Digitogenin-Proben.
a)-c), e)-g), i)-l): je 1.-3. Reinigungsschritt auf Dünnschicht
d), h), m): Reinprodukte auf Papier (System b, vgl. Tab. 2)

d) Tritierung des Ecdysons nach der Platin-Kohle-Methode

Die mit der Platin-Kohle-Methode gewonnenen Ergebnisse bei der Tritierung von Digitogenin rechtfertigten einen entsprechenden Ecdyson-Versuch.

Die Schwierigkeiten bei der Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen seien kurz umrissen. Die höchste, mit der Platin-Kohle-Methode erhaltene spezifische Aktivität des Digitogenins betrug $6,6 \mu\text{C}/\text{mg}$, die bei einer Beladungsdichte von 6 %, einer Adsorbatmenge von 375 mg, einer Tritiummenge von 2 C, einer Temperatur von 20°C , und einer Reaktionszeit von 7,5 Stdn. resultierte. Für das Ecdyson war aber eine deutlich höhere Ausbeute wünschenswert. Um dies zu erreichen, schien die Veränderung der Reaktionsparameter im Sinne einer Austauschsteigerung günstig, freilich unter dem Vorbehalt, daß sich das empfindliche Hormon trotzdem ganz anders verhalten könnte. Nach den bisherigen Erfahrungen bei den Kohleversuchen konnten höhere spezifische Aktivitäten durch Herabsetzung der Beladungsdichte, Vermehrung der Tritiummenge und Verlängerung der Reaktionszeit erzielt werden. In wieweit sich diese Erfahrungen auf die Platin-Kohle-Methode übertragen ließen, war kaum abzuschätzen; jedoch waren in gewissem Rahmen wohl keine allzu großen Abweichungen vorauszusehen. Deshalb wurde eine 3,5 %ige Beladungsdichte auf der 10 %igen Platin-Aktivkohle, eine Adsorbatmenge von 430 mg, eine Tritiummenge von 5 C, eine Temperatur von 20°C und eine Reaktionszeit von 89 Stdn. gewählt. Das Ecdysonadsorbat wurde in einer Apparatur nach Wenzel et al.⁴²⁾ mit Tritium beschickt. Der Druck in der Reaktionsampulle betrug zu Beginn 136 mm Hg und sank innerhalb weniger Minuten auf 34 mm Hg ab. Nach dem Ende der Markierungszeit wurde das Präparat 4 Stdn. lang mit einer Hg-Diffusionspumpe ausgepumpt. Das eluierte Ecdyson wurde in üblicher Weise durch Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die Isolierung und Reinigung ist in Tab. 10 zusammengefaßt.

Eingesetzte Substanz- menge (mg)	Eluierte Substanz- menge (mg)		Spezif. Aktiv. d. Roh- produktes ($\mu\text{C}/\text{mg}$)*	Spezifische Aktivität ($\mu\text{C}/\text{mg}$) nach dem Reinigungsschritt		
	grav.	spekt.		Nr.1	Nr.2	Nr.3
15,0	15,35	12,0	9,20	0,69	0,27	0,17

Tab. 10: Isolierung und Reinigung der tritierten Ecdysonprobe.
(*von labilem ^3H befreit)

Es fiel auf, daß nur 80 % der eingesetzten Substanzmenge nach der Elution spektrometrisch nachzuweisen waren; möglicherweise war der Rest doch durch Tritiumaddition hydriert bzw. auf andere Weise zerstört worden. Eine auf einer analytischen Platte (Schichtdicke 0,2 mm) entwickelte kleine Menge (etwa 20 μg) zeigte im UV-Licht 4 Produkte, die durch die Markierung entstanden waren. Die Hauptmenge wurde sodann auf 2 Platten (Schichtdicke 0,6 mm) chromatographiert. Nach Dünnschichtrechromatographie der dem reinen Ecdyson im UV-Licht zugeordneten Absorptionszone und Papierchromatographie im System b (vgl. Tab. 2) wurde ein Produkt erhalten, das bei erneuter Radiopapierchromatographie ein einheitliches Maximum aufwies und im Calliphora-Test vollaktiv war. Ausbeute: 4,2 mg Ecdyson- ^3H der spezifischen Aktivität 0,17 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

Abb. 9 veranschaulicht die fortschreitende Reinigung und bietet ein Bild von dem Ausmaß der Verunreinigungen. Wie die Abb. 9a zeigt, war die Hauptaktivität (etwa 13 $\mu\text{C}/\text{mg}$) auf 2 Nebenprodukten verteilt, die sich durch Rechromatographie gut auftrennen ließen. Das Produkt mit der höheren Aktivität wurde mit Essigester extrahiert und spektralphotometrisch zwischen $\lambda = 220$ und 350 m μ untersucht (Abb. 9 f). Das erhaltene Spektrum deutet auf eines der Produkte hin, wie sie Hoffmeister beim Salzsäureabbau von Ecdyson gewinnen konnte;³⁸⁾ die UV-Maxima liegen bei 243 und 294 m μ . Auch die dem "unveränderten" Ecdyson entsprechende Zone ließ sich nach der ersten Chromatographie noch in 7 Substanzen auftrennen, wie die Abb. 9 b zeigt. Man kann sie

in lipophile Produkte einteilen, die vermutlich durch Wasserabspaltung und weitgehenden Verlust von Hydroxylgruppen entstanden sind, und in relativ hydrophile Substanzen, die z.B. "nur" durch Tritiumaddition verändert wurden. Zuverlässige Aussagen hierüber lassen sich solange nicht geben, als die genaue Konstitutionsformel des Ecdysones noch nicht vorliegt.

Als günstig erwies es sich, die Kieselgelfraktion, die das Ecdyson trug, jeweils im Soxhlet-Extraktor mit Essigester 12 Stdn. lang bei 85°C zu eluieren, um die mit Methanol extrahierbare, sog. lösliche Kieselsäure aus dem Kieselgel auszuschalten. Dadurch wurden meist kristallisierte Rückstände gewonnen, falls die Extraktionshülse zuvor mit Aceton und Essigester gründlich vorgereinigt war.

Wider Erwarten lag die spezifische Aktivität des gereinigten Produktes etwa um das 40-fache unter der des zweiten Adsorptionsversuches. Genaue Gründe dafür können zur Zeit nicht angegeben werden, da die Einflüsse der verschiedenen Reaktionsparameter noch weitgehend unbekannt sind.

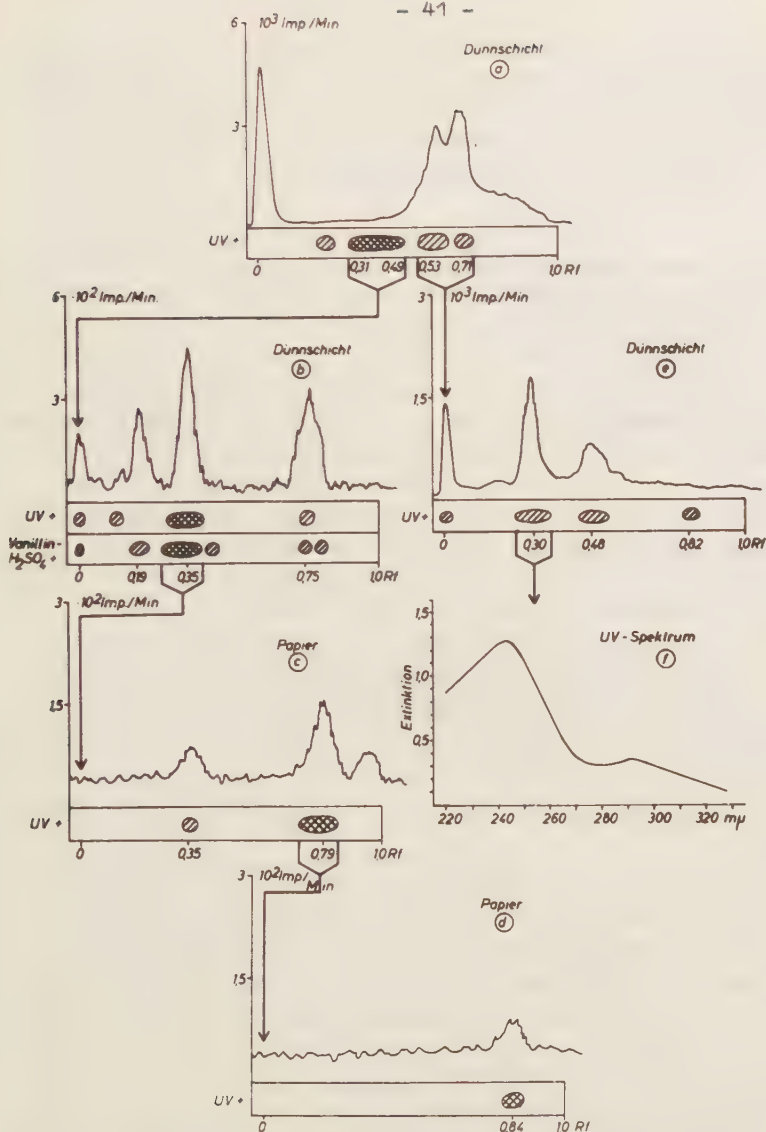


Abb. 9: Reinigung der nach der Platin-Kohle-Methode tritieren Ecdyson-Probe (Versuch 3).

e): Laufmittel: Methylenchlorid 70 V/V
 Aceton 30
 Äthanol 10
 d): Laufmittel: System b (vgl. Tab.2)

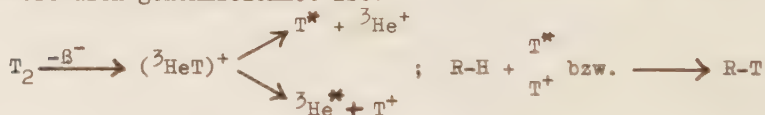
4. Diskussion

a) Reaktionsmechanismus und Reaktionsbedingungen bei der Tritiummarkierung nach Wilzbach

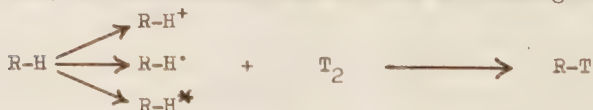
Aus den dargelegten, experimentellen Ergebnissen kann man mit Sicherheit die Bedeutung einiger Reaktionsparameter für die Tritiummarkierung nach Wilzbach erkennen.

Seit der Einführung der Gasaustauschmethode durch Wilzbach 1957 haben sich einige Arbeiten mit dem eigentlichen Reaktionsmechanismus des Verfahrens befaßt;²⁵⁾ man versprach sich davon Kenntnisse über die günstigsten Reaktionsbedingungen. Wenn auch die Versuche bisher keine völlige Klarheit über den eigentlichen Reaktionsablauf brachten, so schälten sich doch im Verlaufe der Diskussion 2 Reaktionen heraus, die mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle spielen:

1. Der zerfallsinduzierte Mechanismus, der durch die Reaktion der angeregten bzw. ionisierten Spaltprodukte $T^* + {}^3\text{He}^+$ und ${}^3\text{He}^* + T^+$ des Tritiumzerfalls mit intakten organischen Molekülen gekennzeichnet ist:



2. Die β -Radiolyse, bei der die organischen Moleküle selbst durch β -Energieabsorption zu energetisch ausgezeichneten Ionen, Radikalen und angeregten Molekülen umgewandelt werden, die mit molekularem Tritium weiterreagieren:



Darüber hinaus kommt für den Platin-katalysierten Wasserstoff-Tritiumaustausch vor allem die Chemosorption sowohl der organischen Substanz- als auch der Tritiummoleküle an die aktivsten Stellen der Katalysatoroberfläche in Frage.⁴³⁾ Trotz der schwa-

chen Bindungskräfte können die C-H-Bindungen gelockert und gespalten werden, worauf der Einbau von Tritium erfolgt. Diese Reaktion erinnert an die Deuterium-Markierung organischer Moleküle; sie ist demnach vom radioaktiven Zerfall des Tritiums und von der dabei freigesetzten β -Energie unabhängig.

Aus den Ergebnissen und vorgeschlagenen Mechanismen kann man wichtige Rückschlüsse auf die Wahl optimaler Reaktionsbedingungen ziehen. Darauf hat auch Wilzbach 1961 hingewiesen.²²⁾ Aus dem ersten Mechanismus ersieht man leicht, daß die Ausbeute an markierter Substanz von der eingesetzten Tritiumaktivität abhängig ist. Auch nach dem zweiten Mechanismus ist sie davon abhängig, da der G_T -Wert (die Anzahl inkorporierter T-Atome pro 100 eV Energieabsorption) der Tritiummenge proportional ist.⁴⁴⁾

Die Ergebnisse der Pregnan- und Pregnantritierungen stehen damit in gutem Einklang. Die relativ hohen spezifischen Aktivitäten von 161 und 252 $\mu\text{C}/\text{mg}$ sind vor allem den hohen Tritiummengen (33 Curie) zuzuschreiben, die infolge der hierbei angewandten Kohle-Adsorptionsmethode erforderlich werden. Die Wahl einer genügend hohen Tritiumkonzentration ist somit wichtig. Es ist einleuchtend, daß die Aktivkohle selbst einen beträchtlichen Teil des Tritiums adsorbiert, welcher dann für den gewünschten Austausch nicht mehr zur Verfügung steht. Der Verlust von Strahlungsenergie ist die Folge. Als Beweis dafür können die Kohleversuche gelten, bei denen von 33 bzw. 40 Curie eingesetztem Tritium nur 22 bzw. 25,4 Curie zurückgewonnen wurden. Im Zusammenhang damit ist die Wahl der Beladungsdichte der Substanz auf der Aktivkohle bedeutsam. Man muß beachten, daß einmal mit sinkender Konzentration auf dem Adsorbens die zu tritierende Verbindung in dünnere Schichten ausgebreitet und somit die Effektivität der Markierung erhöht, gleichzeitig aber dadurch auch der Gewichtsteil der Kohle am Gesamtgewicht des Adsorbates gesteigert wird. Wegen des enormen Tritiumverlustes durch Adsorption muß es demnach ein optimales Mengenverhältnis zwischen Adsorbens und adsorbierter Substanz geben, eine Vermutung, die auch Meshi et al. äußerten.⁴⁰⁾ Verringerungen der spezifischen Aktivitäten gegenüber Kontrollversuchen, wie sie die japanischen Autoren bei ihren Kohleversuchen beobachteten, sind da-

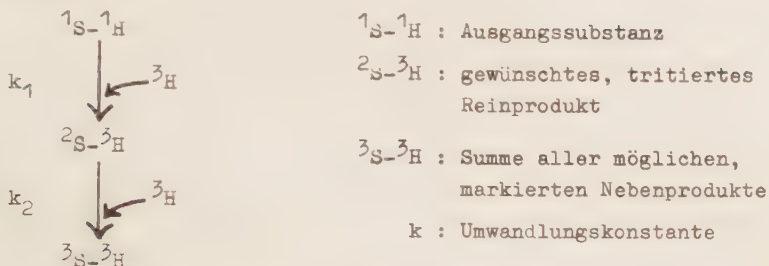
her verständlich. Man kann daraus schließen, daß die Verwendung hoher Tritiumaktivitäten gerade bei der Kohle-Adsorptionsmethode oft ratsam ist.

Vergleicht man die Mengen an radioaktiven Verunreinigungen, die bei allen Tritierungsversuchen entstanden sind (Tab. 5, 9, 11), und zieht die Reaktionszeiten mit in Betracht, so fällt auf, daß diese Mengen mit der Zeit erheblich ansteigen. Aus Untersuchungen von Rydberg et al. an p-Aminosalicylsäure ist bekannt, daß mit Zunahme der Tritierungsdauer (bis zu 5 Tagen) in linearer Abhängigkeit auch die spezifische Aktivität des gereinigten Produktes anwächst;⁴⁵⁾ einen exponentiellen Anstieg beobachteten Bergström et al. beim Markieren von Cholsäure zwischen 1,5 und 28 Tagen.⁴⁶⁾ Ferner haben Ache et al. bei der Tritierung von Toluol einen anfänglich verzögert exponentiellen Verlauf der zeitlichen Tritiumaufnahme in die Seitenkette gefunden, welcher schließlich einem Grenz- oder Sättigungswert zustrebt; auf die Bedeutung der Reaktionszeit als wichtigen Parameter für die Ausbeuten wurde hingewiesen.²⁵⁾

Daß die spezifische Aktivität eines tritiierten Reinproduktes und das Ausmaß an radiochemischen Nebenprodukten zeitabhängig sind, folgt schon theoretisch aus dem erwähnten zweiten Reaktionsmechanismus, weil die Mengen der durch β -Energieabsorption gebildeten organischen Ionen, Radikale und angeregten Moleküle der Reaktionszeit proportional sind. Auch die eigenen Versuche zeigen, daß im Reinprodukt des Ecdyson-Versuches 1 (29 Tage) 4,9 %, des Ecdyson-Versuches 2 (43 Tage) aber nur 0,24 % der eingesetzten spezifischen Aktivität des entsprechenden Rohproduktes enthalten sind; die Nebenprodukte sind also im zweiten Versuch erheblich angewachsen. Daß in kurzen Reaktionszeiten sehr viel weniger Verunreinigungen entstehen, zeigt auch das Digitogenin-Kohleadsorbat; nach 7,5 Stdn. waren noch 52,5 % der im Rohprodukt enthaltenen Aktivität im Reinprodukt nachzuweisen.

Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Substanzmolekül ^1H gegen ^3H bis zu einem Grenzwert austauscht und mehrmals unerwünschte Zersetzungsreaktionen in exponentiellem Maße eingeht, kann durch

folgendes Bild veranschaulicht werden:



Man kann sich vorstellen, daß im ersten Zeitabschnitt einer Tritierung die Reaktion k_1 , die zum gewünschten Reinprodukt führt, schneller abläuft als die Reaktion k_2 , die als "Summenreaktion" aller möglichen Substanzumwandlungen und -zersetzungen anzusehen ist. Die Reaktion k_2 wird aber durch fortwährende Einwirkung von Tritium auf das Reinprodukt im zweiten Zeitabschnitt anwachsen und dessen Abnahme zu Gunsten der Nebenprodukte verursachen. Es muß demnach eine optimale Reaktionszeit geben, deren Kenntnis für viele Tritierungen wünschenswert wäre.

Zweifellos hängt diese optimale Reaktionszeit wiederum von den anderen Reaktionsparametern ab, vor allem auch davon, ob mit oder ohne Kohle, mit oder ohne Platin und mit welcher Adsorptionsdichte gearbeitet wird; sie wird ferner von Substanz zu Substanz verschieden sein.

b) Fortschritte und Verbesserungen der Wilzbach-Tritierung

Die Ergebnisse der Modellsteroid-Markierungen zeigen in überzeugender Weise, welche Vorteile die von Wenzel eingeführte Kohle-Adsorptionsmethode bietet. Bei den Versuchen sind die spezifischen Aktivitäten um das 3 - 5-fache gegenüber den nach der üblichen Wilzbach-Technik tritierten Kontrollversuchen erhöht; die Mengen hochmarkierter Nebenprodukte sind geringer, was dem "Schutzeffekt" der Kohle zuzuschreiben ist (Tab. 5,

letzte Spalte). Diese Schutzwirkung erklären Wollenberg et al. mit der Fähigkeit des Kohle-Graphitgitters, überschüssige Energie der auf der Aktivkohle adsorbierten, hoch angeregten Substanzmoleküle aufzunehmen, sodaß der Molekülzerfall weitgehend verhindert werden kann.²⁴⁾ Damit wird nicht nur die Reinigung vereinfacht, sondern auch die Ausbeute an tritiiertem Material, bezogen auf die eingesetzte Aktivität, verbessert. Die bei den Tieftemperaturversuchen erhaltenen, erheblich geringeren Ausbeuten sind möglicherweise mit der stark verringerten Austauschgeschwindigkeit zu erklären. Jedenfalls findet die eingangs (S. 14) dargelegte Vermutung, wonach durch Erzeugung sehr dünner Substanzschichten höhere Austauschraten erzielt werden können, eine gute Bestätigung.

Eine wesentliche Verbesserung der Kohle-Adsorptionsmethode ist in der Nutzenanwendung der theoretischen Überlegung zu erblicken, daß bei diesem Verfahren enorm hohe Tritiumaktivitäten eingesetzt werden müssen. Wollenberg et al. hatten bei ihren Kohleversuchen nur 1,4 bis 5 Curie Tritium bei Adsorbatmengen von 216 - 1168 mg verwendet;^{24, 32)} die spezifischen Aktivitäten ihrer gereinigten Produkte lagen zwischen 0,01 und 16,5 $\mu\text{C}/\text{mg}$. Demgegenüber sind die eigenen Ergebnisse bei den polaren Pregnan- und Pregnenderivaten (161 und 252 $\mu\text{C}/\text{mg}$) als sehr befriedigend zu bezeichnen. Ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten der nach Wilzbach markierten Steroide macht dies deutlich:

Verbindung	Spezif. Aktivität ($\mu\text{C}/\text{mg}$)		Literatur
	roh	rein	
Androstan-3.17-dion	-	2,5	31)
Δ^1 -Androsten-17 β -ol-3-on	-	0,6	31)
1 β -Methyl-androstan-17 β -ol-3-on	-	5,7	31)
1-Methyl- Δ^1 -androsten-17 β -ol-3-on	-	22,4	31)
Cholesterin	178	64	18)
Cholesterin	-	3,1	32)
Cholsäure	-	3200	46)
3 α .7 β .12 α -Trihydroxycholansäure	-	120	55)
Hydrocortison	21	-	47)
Testosteronpropionat	3,1	0,4	32)
Testosteronpropionat	3,2	1,6	32)
Triamcinolon	270	0,7	26)

Tab. 10: Nach Wilzbach tritierte Steroide.

Als methodischer Fortschritt der Kohle-Adsorptionsmethode ist das Platin-Kohle-Verfahren zu bezeichnen. Seine wichtigen Vorteile liegen in den höheren spezifischen Aktivitäten der gereinigten Produkte und in den erheblich kürzeren Reaktionszeiten. Wiederum erscheint die theoretische Überlegung bestätigt, wonach durch Oberflächenvergrößerung und gleichzeitig engeren Kontakt der zu markierenden Substanzmoleküle mit Platin, dessen Katalyseeffekt vom Wasserstoff-Deuterium-Austausch her schon lange bekannt ist, ein beschleunigter Tritiumeinbau zu erwarten ist. Bei dem Platin-Kohle-Versuch mit Digitogenin ist die spezifische Aktivität um das 91-fache, bei dem einfachen Kohlead-sorbat um das 27-fache gegenüber dem Kontrollversuch gesteigert. Meshi et al. fanden bei ihren Platin-Katalyse-Versuchen bei Valin eine maximale Erhöhung um das 29-fache, während die Steigerungsfaktoren ihrer anderen aliphatischen Verbindungen zwischen 3 und 19 lagen.⁴⁰⁾ Ihre geringeren Ausbeuten sind nach den eigenen Erfahrungen auf die Verwendung von nur μC -Mengen an Tritiumgas und auf die mechanische Vermischung gleicher

Mengen der Substanzen und der Katalysatoren -- also ohne Adsorption -- zurückzuführen. Deshalb muß der Oberflächenvergrößerung einige Bedeutung beigemessen werden.

Eigene methodische Verbesserungen haben die Anwendungsmöglichkeit der Kohle-Adsorptionsmethode stark gefördert. Zu erwähnen sind das azeotropische Elutionsgemisch Benzol-Athanol, mit dem man 84 - 96 % der adsorbierten Substanzmenge wiedergewinnen kann, die anforderungsgerechte Reaktionsampulle und die zur Aufnahme der Adsorbate bestimmten Nylonsäckchen, die eine bessere Gasdiffusion und die gleichzeitige Exposition mehrerer Proben in einer Reaktionsampulle erlauben.

c) Tritierung des Ecdysons

Aus den Ergebnissen, die in Tab. 11 übersichtlich zusammengestellt sind, kann man entnehmen, daß die aufgeführten, wichtigsten Reaktionsparameter für die Höhe der erzielbaren Ecdyson-Markierung eine große Rolle spielen.

Versuch	Methode	Temp. (°C)	Belad. dichte (Gew.%)	Adsorbatmenge (mg)	Tritiummenge (C)	Zeit (Tage)	Spezif. Aktivität des Reinformproduktes (µC/mg)	Spezifische Aktivität des Reinformprod. in % der des eingesetzten Rohproduktes
1	Kohle	-196	0,770	652	33	29	2,75	4,90
2	Kohle	+ 20	0,585	834	40	43	6,64	0,24
3	Platin-Kohle	+ 20	3,49	445	5	3,7	0,17	1,84

Tab. 11: Vergleich der unter verschiedenen Bedingungen tritierten Ecdyson-Proben.

Die höchste spezifische Aktivität lieferte Versuch 2. Man kann dies wohl in erster Linie der großen Tritiummenge und der langen Reaktionszeit zuschreiben, die zwar die Nebenprodukte stark

anwachsen, aber auch um das 2,4 bzw. 40-fach höhere Ausbeuten gegenüber den beiden anderen Versuchen gewinnen ließen. Der bei Versuch 1 erhaltene Wert lag analog den Tieftemperaturversuchen der Modellsteroiden (vgl. S. 24) niedrig, während die Ausbeute von Versuch 3 den Erwartungen nicht entsprach. Vermutlich kann man die bei den Kohle-Adsorptionsversuchen gemachten Erfahrungen nicht ohne weiteres auf die Platin-Kohle-Katalyse übertragen; vielleicht sind hierfür noch wesentlich kürzere Reaktionszeiten und erheblich größere Tritiummengen zu empfehlen, um den Tritiumverlust durch ungenutzte Metallbindung zu kompensieren.

Beachtung verdient in diesem Zusammenhang die vermutliche Konstitution und chemische Reaktivität des Ecdysons.³⁸⁾ Nach Hoffmeister ist das Ecdyson ein Pentahydroxysteran mit einer α, β -ungesättigten Ketogruppe; es steht dem Cholesterin nahe und geht biogenetisch aus diesem hervor.⁴⁸⁾ Steroide mit Sauerstoff-Funktionen zeigen bei der Einwirkung von Elektronen⁴⁹⁾ bzw. energiereicher Strahlung⁵⁰⁾ vielfältige Reaktionen. Sofern der für einige andere Fälle bestätigte Tritierungsmechanismus vorwiegend über eine Aktivierung (Anregung und Ionisation) der Ecdysonmoleküle abläuft,²⁵⁾ kann daher angenommen werden, daß durch Absorption der β -Energie in der Hauptsache folgende Umwandlungen stattfinden: Die Elemente des Wassers werden abgespalten, wobei im Molekül eine Doppelbindung entsteht; letztere kann durch Tritiumaddition, besonders leicht bei Gegenwart von Katalysatoren wie Platin, zu einem Produkt sehr hoher spezifischer Aktivität umgesetzt werden (Abb. 6 b und 9 a). Das UV-Spektrum des isolierten Nebenproduktes von Versuch 3 (Abb. 9f) zeigt z.B. Maxima, die auch Hoffmeister bei der Analyse der Salzsäureabbauprodukte fand. Das von ihm beschriebene konjugierte Dien- bzw. Dienon-System scheint sich somit bei Energiezufuhr auf das Ecdysonmolekül bevorzugt auszubilden.

Weiterhin werden Bindungen quartärer C-Atome, z.B. C-13, abgespalten, wobei sich das Restmolekül stabilisiert. So beobachtet man z.B. nach dem Elektronenbeschuß von Hydroxysteroiden im Massenspektrometer immer Bruchstücke, die der um Wasser bzw. die quartär gebundenen Methylgruppen verminderten Molekularspitze entsprechen.⁴⁹⁾ Das Steranringgerüst kann schließlich an

verschiedenen Stellen je nach Substitution aufgebrochen werden.

Bei der Platin-katalysierten Deuterierung von Cholesterin fanden Fukushima et al., daß mehr als 97 % des eingebauten Deuteriums in der Isopropylgruppe der Seitenkette und an den C-Atomen 2 und 4, also in Nachbarschaft zu dem die Hydroxylgruppe tragenden C-Atom 3 verankert waren.⁵¹⁾ Falls diese bevorzugte Markierung auch für das Ecdysonmolekül gilt, würde sich eine Erklärung für die Bildung der zahlreichen Nebenprodukte anbieten, die bei Versuch 3 entstanden sind (vgl. Abb. 9b): Ihr chromatographisches Verhalten legt nahe, daß es sich um "nur" geringfügig, d.h. durch Verlust nur einer Hydroxylgruppe oder zweier Wasserstoffatome veränderte Ecdysonmoleküle handelt.

Bei der üblichen Wilzbach-Tritierung (ohne Platin) von Cholesterin hingegen konnten Schenk et al. zeigen, daß das Tritium über alle wasserstofftragenden C-Atome gleichmäßig verteilt war.⁵²⁾ Das bei Versuch 2 entstandene, stark apolare Nebenprodukt sehr hoher spezifischer Aktivität wäre in diesem Falle mit dem Verlust mehrerer Hydroxylgruppen zu erklären (vgl. Abb. 6b).

d) Autoradiographie mit tritiertem Ecdyson

Zur Klärung der eingangs (S. 10) formulierten Frage, ob das Ecdyson selbst an den Speicheldrüsenchromosomen der Chironomus-Larven angreift, wäre der autoradiographische Nachweis der Lokalisation des tritierten Hormons sehr interessant. Welche spezifische Aktivitäten dafür nötig sind, sollen die folgenden Berechnungen darlegen.

Das Problem bei der Autoradiographie mit Tritium besteht bekanntlich darin, eine ausreichende Anzahl markierter Moleküle in die intrazellulären Strukturen hineinzubringen, um bei vernünftigen Expositionszeiten (1 - 2 Monate) zu befriedigenden Ergebnissen zu kommen; längere Zeiten erhöhen den photographischen Grundschleier und die Gefahr der Artefaktbildung durch Einflüsse des Gewebes auf die Filmemulsion. Unter der Annahme, daß infolge der ungünstigen geometrischen Verhältnisse durch-

schnittlich 20 Zerfälle nötig sind, um ein Silberkörnchen zu erzeugen, und daß mindestens 5 Körnchen zur Lokalisation eines Ortes erforderlich sind, muß ein Autoradiogramm so lange exponiert werden, bis 100 Zerfälle pro Strahlungsort stattgefunden haben. Da die Zerfallsrate für Tritium 0,5 % pro Monat beträgt, müssen an Ort und Stelle $2 \cdot 10^4$ Tritiumatome eingebaut worden sein, um während eines Monats eine zufriedenstellende Schwärzung zu erzielen.⁵³⁾ Nach einer Berechnung von Clever genügen etwa 10^5 Moleküle Ecdyson in einer der großen Speicheldrüsenzellen, um den Puff I-18-C, und etwa 10^6 Moleküle, um den Puff IV-2-B zu induzieren.⁸⁾ Demnach müßte jedes 5. bzw. jedes 50. Ecdysonmolekül, gleichmäßige, statistische Verteilung vorausgesetzt, mit einem Tritiumatom markiert sein, was einer spezifischen Aktivität von 5,84 C/mM (12,6 mC/mg) bzw. 584 mC/mM (1,26 mC/mg) entspräche. Diese berechneten Werte der erforderlichen spezifischen Aktivitäten stehen in guter Übereinstimmung mit dem von Simon (560 mC/mM)²⁰⁾ für ähnliche Bedingungen angegebenen.

Der Gang der Rechnung sei kurz skizziert. Nach der Beziehung⁵⁴⁾

$$M = 7,66 \cdot 10^{-9} \cdot A \cdot T \cdot a$$

M = Masse in g
A = Atomgewicht
T = Halbwertszeit in Tagen
a = Radioaktivität in Curie

hat 1 C ^3H die Masse $1,0283 \cdot 10^{-4}$ g. Mit Hilfe der Loschmidt'schen Zahl erhält man die Zahl der Tritiumatome, die dieser Masse entspricht; demnach sind in 1 C ^3H $2,062 \cdot 10^{19}$ Atome ^3H enthalten. Setzt man die Zahl der Moleküle von 1 mM Ecdyson zu dieser Zahl ins Verhältnis, so gibt der Quotient die Zahl der unmarkierten Moleküle an, die auf ein markiertes Molekül entfallen.

Selbst bei einer spezifischen Aktivität von 50 mC/mM (108 $\mu\text{C/mg}$), einem Maximalwert, der in der Größenordnung einer nach Wilzbach tritiierten 3 α .7 β .12 α -Trihydroxycholansäure-Probe (120 $\mu\text{C/mg}$) liegt,⁵⁵⁾ würde nur jedes 5842. Molekül markiert sein. Deshalb erscheint nur ein durch radiochemische Synthese gewonnenes Ecdyson, bei dem z.B. eine Doppelbindung in der Seitenkette mit Tritium hydriert wurde, für den autoradiographischen Nachweis aussichtsreich.

Diese Überlegungen lassen dabei noch alle Faktoren außer Betracht, die oft die Aussagekraft der Autoradiographie erheblich einschränken, wie z.B. die Gewebevorbehandlung (Art der Fixierung), die autoradiographische Methode (Stripping-Film oder Kernemulsion), die Artefaktbildung und die geometrischen Verhältnisse. Vor allem verursacht die Fixierung von Geweben, die das mit Wasser, Alkohol oder Essigsäure gut auswaschbare Ecdyson enthalten, einige Schwierigkeiten.

Auf Grund von Berechnungen gab Clever an, daß die Anzahl der Ecdysonmoleküle pro haploiden Chromatidensatz bei der geringsten, noch wirksamen Konzentration in der Größenordnung von 10 - 100 liegt.⁸⁾ Falls seine Hypothese zutrifft, wonach die Schwelle der Ecdysonwirksamkeit bei etwa gleicher Konzentration von Effektor Ecdyson und Repressor erreicht wäre (d.h. daß zur Bindung eines Repressors nur ein oder wenige Ecdysonmoleküle erforderlich wären), und falls man sich unter einem Repressor ein Nucleoprotein von relativ hohem Molekulargewicht vorstellt, dürfte der Wert der autoradiographischen Methode für diese Problemstellung in Frage gestellt sein.

Dagegen lassen sich mit dem Austausch-markierten Ecdyson andere Versuche durchführen, die biologisches Interesse haben. Sie sind im folgenden Abschnitt geschildert.

II. Verteilung von Tritium-markiertem Ecdyson in Larven von Calliphora erythrocephala

1. Problemstellung

Mit Hilfe eines markierten Hormons kann man die Frage untersuchen, an welchen Zellstrukturen sich dieses innerhalb bestimmter Zeiten anreichert, und daraus gewisse Schlüsse ziehen. Dieser Weg wurde im vorliegenden Fall beschritten. Sichtbarer Ausdruck der Ecdyson-Wirkung bei Calliphora ist die Sklerotisierung der Larvencuticula durch Einlagerung von Tyrosinmetaboliten (vor allem N-Acetyl-3.4-dihydroxy-phenyläthylamin = N-Acetyl-dopamin¹¹⁾ in die Cuticula. Dieser Prozes ist als aktive Leistung der Epidermis anzusehen. Wenn das genetische Material der Epidermis tatsächlich der erste Wirkort des Ecdysons ist, so müßte die Verteilungsanalyse des Hormons innerhalb bestimmter Zeiten diese Annahme beweisen. Clever hat nämlich zeigen können, daß die Puffinduktion bestimmter Chromosomenabschnitte nach Ecdyson-Injektion schon 30 Min. später sichtbar wird und nach etwa 2 Stdn. ein Maximum erreicht.⁵⁾

Mit den folgenden Versuchen sollten daher diese Befunde mittels Ecdyson-³H auf biochemischem Wege geprüft und erweitert werden.

2. Ergebnisse

a) Zeitliche Verteilung auf Hämolymphe, Epidermis und Fettkörper

Der zeitliche Verlauf dieser Verteilung bei normalen Tieren ist in den Abb. 10a und b wiedergegeben. Injiziertes Ecdyson gelangt zunächst in die Hämolymphe; von dort wird es in die Gewebe abgegeben. Es reichert sich schon 25 bis 30 Min. nach der Injektion in der Epidermis an. Nach 45 Min. ist die höchste Konzentration erreicht; diese liegt nach dieser Zeit etwa 4 mal höher als der entsprechende 15-Min.-Wert. Dann nimmt sie wieder ab und ist nach 7 Stdn. auf die Hälfte des maximalen Wertes abgesunken. (Die in Abb. 10 dargelegte Epidermis-Kurve dürfte be-

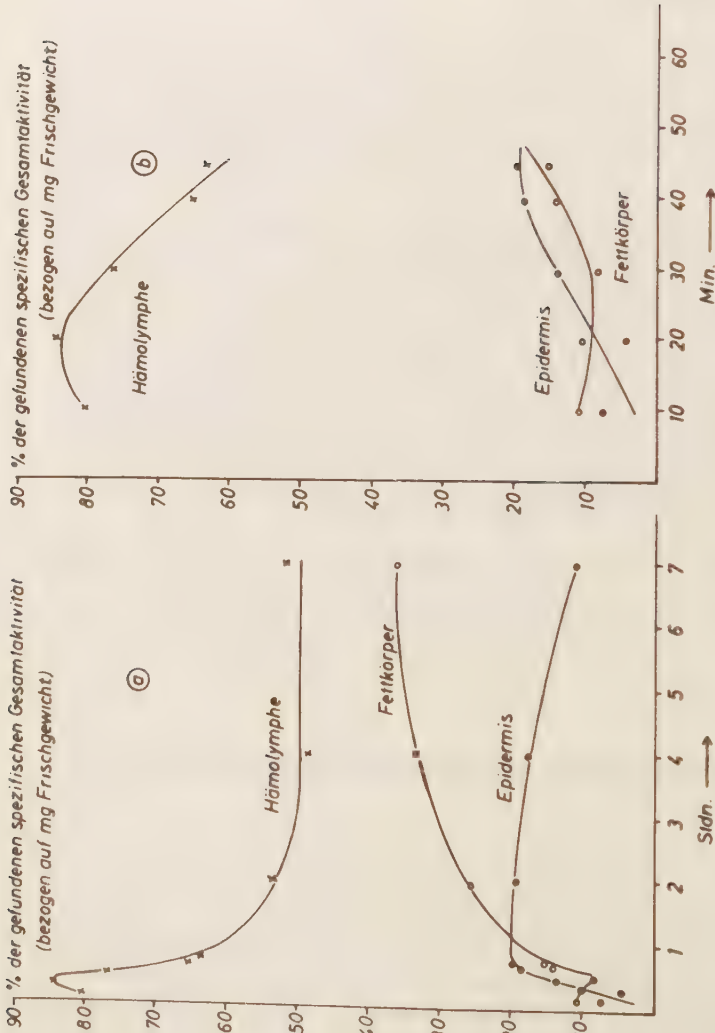


Abb. 10: Verteilung von Ecdyson-³H in Larven von *Calliphora erythrocephala*
 Abszisse: Dauer der Hormoneinwirkung (0,5 µg/Tier). Jeder Kurvenpunkt bildet den Mittelwert von 10 Tieren.
 Abb. 10 a zeigt den Anfang der Kurven der Abb. 10 b in vergrößertem Abszissenmaßstab.

züglich der Ordinatenwerte in Wirklichkeit noch viel ausgeprägter verlaufen, da die hier angewandte Präparationstechnik die Trennung der Epidermis-von der Muskelschicht nicht quantitativ gestattete und da die Epidermisschicht als eigentliches Erfolgsorgan gilt.⁵⁶⁾ Im folgenden bezeichnet deshalb der Begriff "Epidermis" die Summe von Epidermis- und einem Großteil der Muskelschicht, die nach histologischen Befunden etwa im Verhältnis 1 : 10 zueinander stehen.)

Die verhältnismäßig hohe Anfangsaktivität im Fettkörper ist wahrscheinlich auf nicht auswaschbare Hämolymphe zurückzuführen; es ist schwierig, den lappig verzweigten Fettkörper von Hämolymphe freizuwaschen. Die eigentliche Aufnahme von Radioaktivität beginnt erst etwa 35 Min. nach Injektion und erreicht nach 7 - 9 Stdn. ein Plateau. Vermutlich ist dies in einer Abfang- und Inaktivierungsreaktion begründet. Die Konzentration in der Hämolymphe sinkt in den ersten 2 Stdn. rasch ab und bleibt dann konstant.

b) Zeitliche Verteilung zwischen Hämolymphe, Epidermis und Fettkörper von geschnürten Larven

Für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus des Ecdysons wurden oft Tiere herangezogen, die durch Abschnürung der die Prothorakaldrüsen enthaltenden Körperteile von Ecdyson frei waren. Da diese Tiere für die zeitliche Verfolgung der biochemischen Veränderungen nach Hormoninjektion verwendet werden, ist es wichtig zu wissen, wann das Hormon an den Wirkort gelangt.

Wie aus Abb. 11 ersichtlich, tritt eine deutliche Verlangsamung der Aufnahme des Hormons in die Epidermis auf. Wahrscheinlich ist dies in erster Linie der gehemmten Zirkulation der Hämolymphe zuzuschreiben; vielleicht spielen daneben noch Schädigungen der Zellmembranen, die durch Stoffwechselstörungen infolge der Schnürung verursacht sind, eine Rolle.

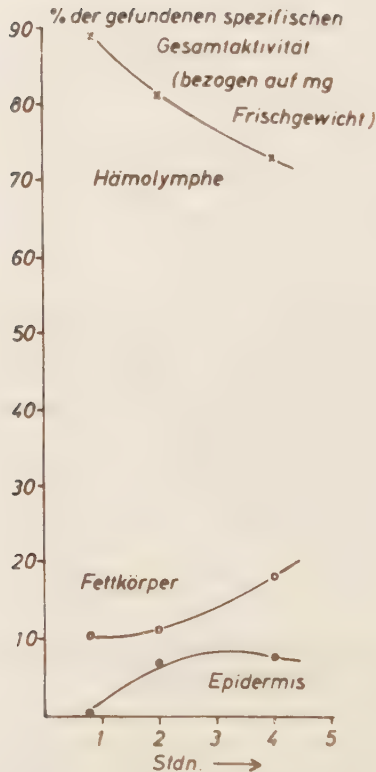


Abb. 11: Verteilung von Ecdyson- ^3H in geschnürten Larven von *Calliphora erythrocephala*

Abszisse: Dauer der Hormoneinwirkung ($0,5 \mu\text{g}/\text{Tier}$).
Jeder Kurvenpunkt bildet den Mittelwert von 10 Tieren.

c) Verteilung auf Zellfraktionen der Epidermis und des Fettkörpers.

Der folgende Versuch sollte die Frage beantworten, von welchen Zellstrukturen Ecdyson bevorzugt gebunden wird.

2,5 Std. nach Injektion von Ecdyson- ^3H wurden die Epidermis- und Fettkörperzellen durch Zentrifugieren in Zellkerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zellsäfte fraktioniert. Bei beiden

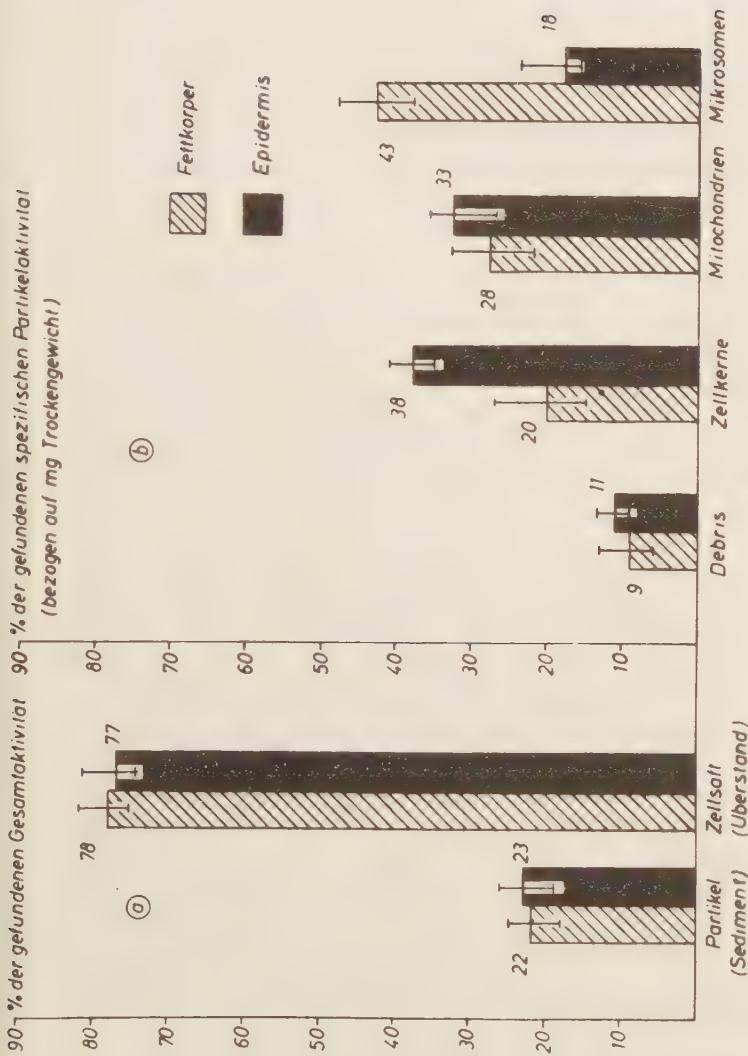


Abb. 12: Verteilung von Ecdyson- ^3H in Zelliraktionen der Epidermis und des Fettkörpers von Galliphora-Larven (2,5 Stdn. nach Injektion von 0,5 $\mu\text{g}/\text{Tier}$).

Abb. 12a: Verteilung der Partikel-gebundenen und der löslichen Radioaktivität.

Abb. 12b: Verteilung der Partikel-gebundenen Radioaktivität.
(Debris = Zelltrümmer und Muskelfasern, die während der 3 min. Zentrifugation bei 150 U./Min. abgeschleudert wurden.) Jeder Kolonnenwert bildet den Mittelwert von 4 Versuchen mit je 34 Tieren.

Gewebe finden sich etwa 80 % der wiedergefundenen Radioaktivität im Zellsaft, sind also nicht oder nur sehr locker gebunden (Abb. 12a). Die Verteilung des gebundenen Anteils ist allerdings bei beiden Geweben recht verschieden (Abb. 12b). In der Epidermis läßt sich eine große Menge in den Zellkernen, ein weiterer großer Anteil in den Mitochondrien nachweisen. Beim Fettkörper fällt die hohe Aktivität der Mikrosomenfraktion auf. Kerne und Mitochondrien sind entsprechend weniger markiert.

3. Diskussion

Der zeitliche Verlauf der Markierung der einzelnen Gewebe erinnert sehr an das Verhalten von Testosteron. Wie Butenandt et al. gefunden haben, wird markiertes Testosteron verhältnismäßig schnell vom Samenblasen-Gewebe der Ratte aufgenommen und verläßt dieses Erfolgsorgan auch bald wieder.⁵⁷⁾ Dagegen zeigt sich in der Leber, dem Inaktivierungs- und Ausscheidungsorgan, ein langsamer Anstieg der Radioaktivität nach Gabe des markierten Hormons. Nun gibt es zahlreiche Hinweise dafür, daß der Fettkörper bei den Insekten die gleichen Aufgaben erfüllt wie die Leber beim Wirbeltier. Deshalb erscheint die Annahme vernünftig, daß das markierte Hormon zunächst größtenteils in der Epidermis konzentriert und dann auch rasch in den Fettkörper abgegeben wird. Die langsame Zunahme der Radioaktivität dieses Gewebes wird man nicht nur dem unveränderten Hormon, sondern wohl auch dessen Speicherungs- und Inaktivierungsprodukten zuschreiben haben. (Die erwachsenen Larven besitzen keine sehr aktiven Ausscheidungsfunktionen mehr, da sie sich auf die Puppenruhe vorbereiten.) In Übereinstimmung damit findet man eine erhebliche Radioaktivität in den Mikrosomen, die bekanntlich für viele Reaktionen des Steroidstoffwechsels bei den Säugetieren verantwortlich sind.⁵⁸⁾ Da das Ecdyson nach neueren Ergebnissen zu den Steroidhormonen gehört,³⁸⁾ sollte sich diese Regel auf das Insektenhormon übertragen lassen.

Die Epidermis hingegen können wir als Erfolgsorgan des Ecdysons ansehen.⁵⁶⁾ Das geht schon aus den biologischen Fakten hervor -- Ecdyson ist als Häutungshormon bekannt -- , und steht auch in

Einklang mit biochemischen Befunden über die Sklerotisierung und deren Kontrolle durch Ecdyson.¹¹⁾ In diesem Zusammenhang verdient die Tatsache Beachtung, daß das Ecdyson verhältnismäßig rasch in die Epidermis gelangt. Bei den Versuchen an Chironomus waren die ersten Puff-Veränderungen gleichfalls 30 Min. nach Injektion beobachtet worden.⁵⁾ Daß das Hormon in so kurzer Zeit an seinen Wirkort gelangt, verdankt es in erster Linie seiner im Verhältnis zu anderen Steroidhormonen bemerkenswert guten Wasserlöslichkeit (450 µg/ml) und damit Löslichkeit in der Hämolymphe. Testosteron andererseits, dessen Konzentrationsmaximum erst nach 90 Min. im Samenblasengewebe erreicht ist,⁵⁷⁾ muß erst durch Bindung an Serumalbumine transportfähig gemacht werden und am Wirkort abdissoziieren.⁵⁹⁾ Die Anreicherung des Ecdysons in den Zellkernen der Epidermis kann man als weitere Stütze für die Hypothese ansehen, daß die Steroidhormone durch Regulation von Genaktivitäten zur Wirkung kommen. Weitere Experimente freilich müssen diese Hypothese erhärten.

Für die komplexe Hormonwirkung des Ecdysons ist nicht ausschließlich die Genaktivierung zu diskutieren, um die hohe Aktivität der Mitochondrienfraktion erklären zu können. Vielleicht stellen die Mitochondrien einen weiteren Angriffspunkt für die Wirkung des Hormons dar. Eine entsprechende Hypothese war schon vor längerer Zeit von wigglesworth entwickelt und vor allem durch histologische und elektronenoptische Beobachtungen gestützt worden.⁶⁰⁾ Danach findet man bei der Wanze Rhodnius etwa 6 Stdn. nach Ecdyson-Injektion eine Schwellung der epidermalen Mitochondrien. Welche Funktion sich in dieser Schwellung widerspiegelt, und ob es sich um eine spezifische Wirkung des Ecdysons handelt, ist allerdings noch ungeklärt.

C) EXPERIMENTELLER TEIL

I. Markierungsversuche

Reinigung der Aktivkohle

Aktivkohle (Merck) zur Gaschromatographie Nr. 9624, auf Teilchengröße 0,1 - 0,2 mm eingestellt (Staubanteil $< 0,1\%$), wurde mit 20 % iger Salzsäure etwa 15 Min. erhitzt, abfiltriert und mit dest. Wasser solange gewaschen, bis das Filtrat neutral reagierte und chloridfrei war. Dann wurde das Wasser mit warmem Aceton verdrängt, dieses wiederum mit warmem Benzol. Anschließend wurde mit dem Gemisch Benzol-Athanol 2 : 1 (V/V) 36 Stdn. im Soxhletapparat extrahiert.

Darstellung des 10 % igen Platin-Aktivkohle-Katalysators

790 mg Hexachloroplatin-IV-Säure ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mit 38 % Pt) wurden in etwa 50 ml Wasser unter Erwärmen gelöst und mit der Suspension von 3 g vorgereinigter Aktivkohle in 300 ml Wasser vereinigt. Nach 1-stündiger Reduktion mit gereinigtem Wasserstoff wurde abfiltriert, mit viel warmem Wasser bis zur neutralen Reaktion und Chloridfreiheit gewaschen, mit Aceton nachgewaschen und im Exsikkator 48 Stdn. über P_2O_5 im Vakuum bei 0,4 mm Hg getrocknet. Unter Stickstoff wurde der Exsikkator geöffnet.

Adsorption der Steroide an Aktivkohle

Nach Schütteln der Steroidlösungen in Athanol-Benzol 5 : 1 (V/V) mit der vorgereinigten Aktivkohle wurden im Filtrat die nicht-adsorbierten Substanzmengen gravimetrisch und im Falle der α , β -ungesättigten Ketone (Pregnenderivate und Metyson) und des Digitogenins auch spektrometrisch bestimmt. An Hand des Lambert-Bouguer-Beerschen Gesetzes ließen sich Eichkurven berechnen, mit deren Hilfe die nichtadsorbierten Substanzmengen leicht festzustellen waren (vgl. S. 61). Aus den Verhältnissen zu den eingesetzten Kohlemengen ergaben sich somit die Adsorptionsdichten. Bei echter Adsorption bewegten sich diese zwischen 0,7 und 1,5 Gew.%. Das der Kohle anhaltende Lösungsmittel wurde durch 10-stündiges Erwärmen und vorsichtiges Evakuieren entfernt.

Spektrometrische Mengenbestimmungen der adsorbierten und eluierten Verbindungen

Nach der Gleichung

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

ϵ = molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient in Liter/Mol
· cm

c = molare Konzentration

d = Schichtdicke der Küvette
in cm

ließ sich die Konzentration einer Lösung bei gegebener Extinktion und Schichtdicke der Küvette berechnen:

Substanz	Mol.-Gew.	$\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$	ϵ	E	d	$c \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{g/ml}$
Ecdyson	464,4	242	12400	1,0	1	8,0646	37,452
Pregnen-derivat*	402,4	228	10700	1,0	1	9,520	38,308

* (Δ^1 -5 α -Pregnen-17 α -21-trion-(3.11.20)-21-acetat)

Die berechneten Eichkurven sind in Abb. 13 und 14 wiedergegeben. Bei allen Eluierungen wurden zunächst in einem Blindversuch die Grundadsorption des Kieselgels bzw. des Papiers spektrometrisch und der Rückstand gravimetrisch ermittelt; die erhaltenen Werte wurden von den entsprechenden Werten der Hauptbestimmungen abgezogen. Ein Beispiel dafür bietet Abb. 15. Digitogenin wurde durch Behandlung mit konz. Schwefelsäure während 14 Stdn. bei 41°C zum Chromogen umgewandelt.⁶¹⁾ Mittels verschiedener Substanzeinwaagen ließ sich eine Eichkurve aufstellen (Abb. 16).

Exposition der Adsorbate in Nylonsäckchen

Die Nylonsäckchen wurden aus dem Nylongewebe MOnyl 37 F der Firma MOnyl, Züricher Beuteltuchfabrik AG, Zürich 40, folgendermaßen hergestellt: Gewebestückchen der Größe 40 x 40 mm wurden einmal gefaltet, die Ränder an zwei Seiten mittels ei-

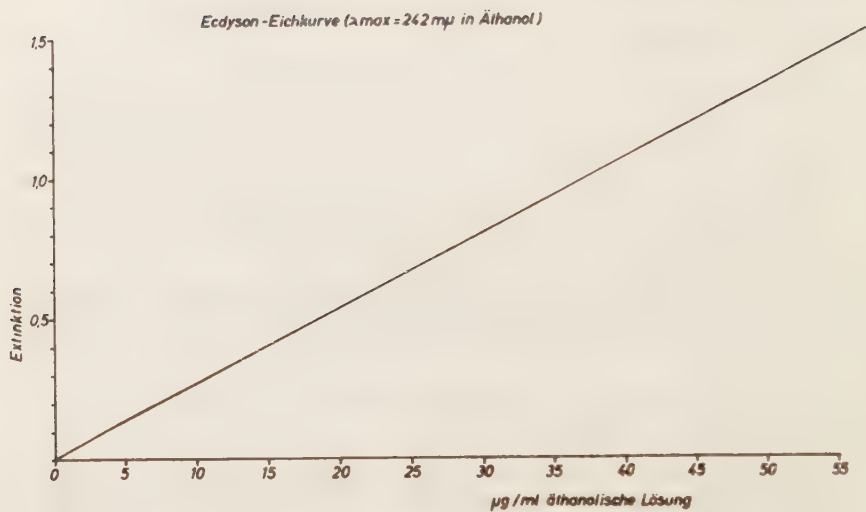


Abb. 13: Ecdyson-Eichkurve

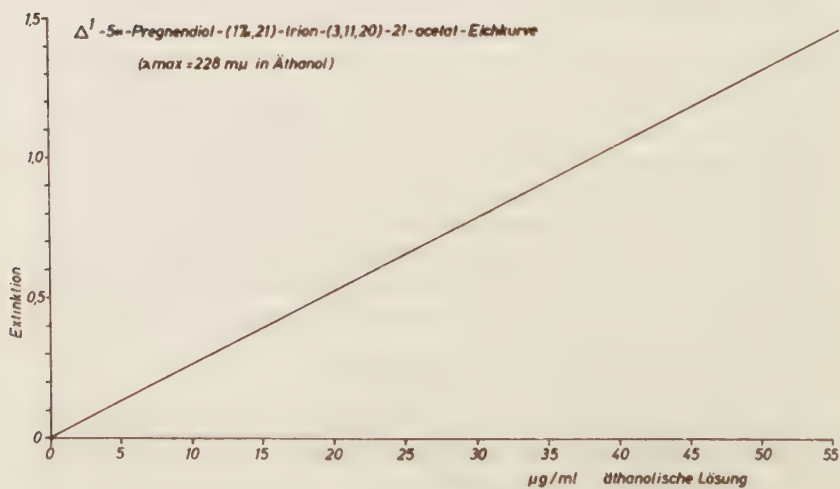


Abb. 14: Eichkurve des Pregnenderivates

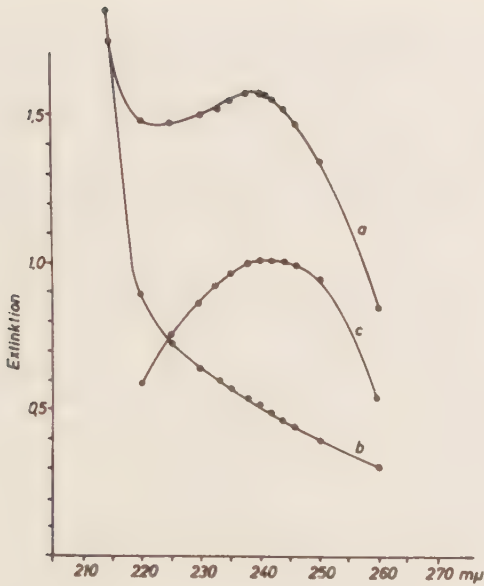


Abb.15: Bestimmung der aus einem Papierchromatogramm eluierten Ecdysonmenge

- a) Erhaltenes UV-Spektrum des Eluates
- b) UV-Spektrum des Papierblindeluates
- c) Wahres UV-Spektrum des eluierten Ecdysons (durch Subtraktion der Kurve b von der Kurve a erhalten).

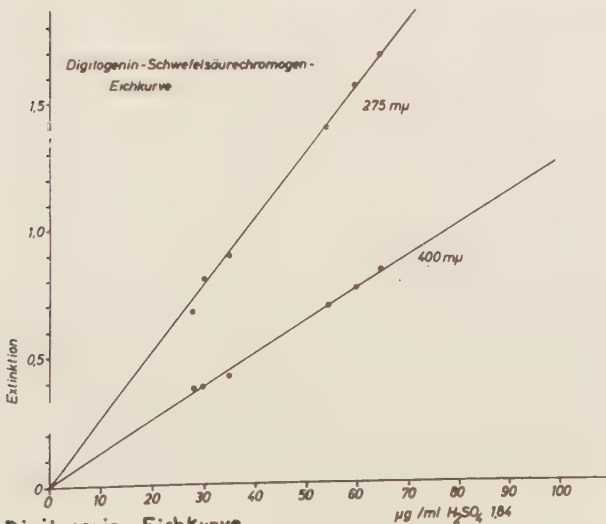


Abb.16: Digitogenin - Eichkurve

ner Pinzette zusammengehalten und in der Sparflamme eines Bunsenbrenners verschweißt. Nach Einfüllen der Kohleadsorbate wurde die letzte Seite in gleicher Weise verschlossen. Das verwendete Nylongewebe hatte eine Maschenweite von 0,037 mm, eine offene Siebfläche von 26 %, eine Fadenzahl von 140 pro cm Kette und zeigte bei -196°C keine Brüchigkeitserscheinungen während 30 Tagen.

Reaktionsgefäße und Tritierungsbedingungen

An Ampullen aus Duranglas, deren "Bäuche" 18 x 35 mm und deren "Hälse" 11 x 40 mm groß waren, wurden nach Einbringen der gefüllten Nylonsäckchen Kapillarrohre angeschmolzen (1 mm $\varnothing$, 130 mm lang). Im Falle der Kohle-Adsorptionsversuche (S. 22 und 28) wurden die Ampullen durch vom Radiochemical Centre, Amersham, England, angeschmolzene Vakuumhähne evakuiert und mit Tritium beschickt; die Hähne wurden sodann wieder abgeschmolzen. Das Tritium wurde nach der vorgeschriebenen Expositionszeit durch Brechsiegel abgepumpt (vgl. Abb. 2). Im Falle der Platin-Kohle-Versuche (S. 33 und 38) wurde eine Tritierungsapparatur nach Wenzel et al.⁴²⁾ benutzt. Die Reaktionsgefäße waren den geringeren Tritiummengen angepaßt; sie bestanden aus "Birnen" der Maße 20 x 9 mm, an deren "Hälse" von 60 mm Länge ($\varnothing$ 6 mm) Schliffhülsen (NS 7,5) angeschmolzen waren.

Elution der an Kohle adsorbierten Substanzen

Mit dem Gemisch Benzol-Äthanol 1 : 1 (V/V) wurden die Adsorbate bei 85°C 100 Min. lang im Mikro-Soxhlet-Apparat unter häufiger Entleerung der Extraktionshülse (mindestens 2 mal/Min.) extrahiert. Als Heizquelle empfahl sich ein Wasserbad.

Bestimmung der Radioaktivitäten

Die Radioaktivitäten wurden bei den Kohle-Adsorptionsversuchen aus aliquoten Teilen der Eluate auf Aluminiumschälchen bei einer durchschnittlichen Schichtdicke von $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in einem Methan-Durchflußzähler FH 407 der Firma Fricsecke & Höpfner mit einer Zählausbeute von 43,5 % ($\pm$ 3 %) nach Rydberg bestimmt.⁶²⁾ Der bei dieser Methode resultierende statistische Fehler (Berechnung vgl. S. 21, Fußnote) aus je 3 verschiedenen Meßproben be-

trug $\pm 6\%$. Bei den Platin-Kohle-Versuchen wurde ein TriCarb Liquid Scintillation Counter Modell 314 LX der Firma Packard Co. benutzt, der eine Zählausbeute von $28,2\%$ ($\pm 0,8\%$) lieferte. Der hierbei ermittelte statistische Fehler aus je 3 verschiedenen Meßproben betrug $\pm 2,7\%$. Die Szintillationslösung hatte die Zusammensetzung : 5,0 g 2.5-Diphenyloxazol (PPO), 0,1g 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyloxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP) in 1 Liter Toluol p.a.. Nulleffekt: 40-60 Imp./Min.

Die Aktivitätsverteilung auf den Dünnschichtplatten wurde mit dem von Schulze et al. entwickelten Spezialzählrohr bei einer Zählausbeute von etwa $0,3\%$ erhalten;³¹⁾ die Papierchromatogramme wurden mit einem Doppelzählrohr nach Wenzel mit einer Zähl- ausbeute von etwa 2% ausgemessen.⁶³⁾

Die in den Tab. 4 und 7 aufgeführten prozentualen Verunreinigungen wurden planimetrisch aus den Radiochromatogrammen errechnet.

Dünnschichtchromatographie

Die konzentrierten Lösungen der Substanzen in Chloroform-Methanol (im Falle der Kohle-Adsorptionsversuche) bzw. Benzol-Äthanol (im Falle der Platin-Kohle-Versuche) wurden mittels Kapillarröhrchen ($\varnothing 0,4$ mm) Punkt neben Punkt zu einem 11 - 12 cm breiten Startband auf 0,5 bis 0,7 mm dicken, 8 Stdn. lang mit Methanol vorgereinigten Kieselgel G-bzw. H-Schichten aufgetragen und in gesättigten Trennkammern bei 22°C entwickelt (Laufstrecke 15,5 - 18 cm). Zur Identifizierung der radioaktiven Fraktionen wurden die inaktiven Steroide an beiden Seiten der Platten mitchromatographiert und im Falle der Modellsteroide nach Anfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, im Falle des Digtogenins nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure und 1 % iger Vanillin-Phosphorsäure (verdünnt mit Methanol 1 : 1) und anschließend Erhitzen, mit den aktiven Zonen verglichen. Für das Ecdyson hat sich das Leuchtpigment ZS Super (der Firma Riedel de Haën AG) bewährt; das Hormon gibt sich durch seine blauviolette Absorption im UV-Licht ($\lambda = 254$ m μ) empfindlich zu erkennen. Die mit den entsprechenden Aktivitätsmaxima übereinstimmenden Hauptfraktionen wurden sorgfältig abgeschabt und im

Mikro-Soxhlet-Apparat mit dem Gemisch Chloroform-Methanol bei 70°C bzw. Benzol-Athanol bei 83°C (Wasserbad) eluiert; bei kleineren zu extrahierenden Substanzmengen (< 3 mg/Platte) wurde die Kaltextraktion vorgezogen (vgl. S. 21).

Papierchromatographie

Das hierfür verwendete Papier der Firma Macherey & Nagel MN 2214 ff mußte in allen Fällen mit der stationären Phase über Nacht gesättigt werden. Die interessierenden Zonen wurden mit Methanol p.a. eluiert. Die Laufstrecke betrug 23 - 26 cm.

II. Analyse der Verteilung von tritiiertem Ecdyson

Tiermaterial und Injektion

Die verwendeten 7 - 8 Tage alten Larven von *Calliphora erythrocephala* stammten aus Massenzuchten des Instituts. Sie wurden in den Versuch genommen, wenn 20 % der Tiere verpuppt waren; die verwendeten, nicht verpuppten Tiere befanden sich dann im Mittel 15 - 18 Stdn. vor der Verpuppung. Sie erhielten seitlich ins Abdomen eine Injektion von 0,5 µg Ecdyson-³H in 5 µl Wasser, entsprechend einer Aktivität von etwa 7500 Zerfällen/Min.

Aufarbeitung der Gewebe

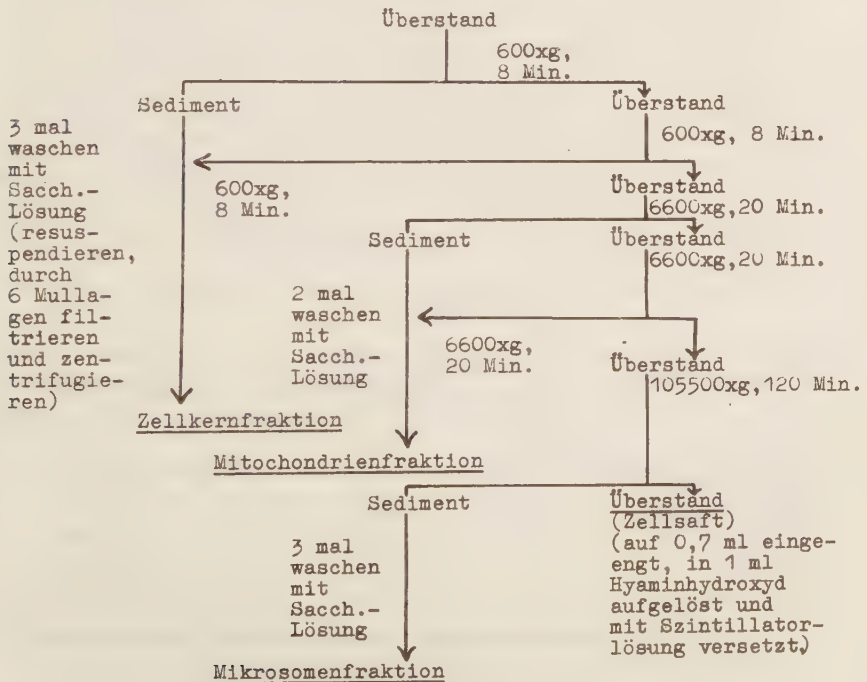
Nach den angegebenen Zeiten wurden je 10 Tieren innerhalb einer Min. die Köpfe abgeschnitten und die auslaufende Hämolymphe aufgefangen. Der Fettkörper und die Epidermis wurden getrennt präpariert und mit eiskalter 0,25 M Saccharoselösung gründlich von anhaftender Hämolymphe freigewaschen.

Jedes Gewebe wurde 3 - 5 Min. in 1 ml Hyaminhydroxyd 10-X (Dimethyl-{2-[2-(p-diisobutyl-methyl-phenoxy)-äthoxy]-äthyl}-benzyl-ammoniumhydroxyd, bezogen von der Firma Packard Co.) homogenisiert, das Homogenat in ein Reagenzglas gegeben, das Homogenisatorglas mit 1 ml Hyaminhydroxyd und 0,5 ml Methanol ausgespült und mit dem Homogenat vereinigt. Das Reagenzglas wurde verschlossen und unter häufigem Umschütteln 24 Stdn. bei 60°C gehalten. 1 ml jeder Probe wurde dann in ein Packard-

Fläschchen pipettiert und mit 15 ml Szintillatorlösung, der 5 % Aerosil beigegefügt war, versetzt.

Herstellung der Zellfraktionen

Nach der angegebenen Zeit wurden 34 Tiere in Epidermis und Fettkörper präpariert. Jedes Gewebe wurde 2 mal mit je 8-10 ml eiskalter 0,25 M Saccharoselösung durch Zentrifugieren in einer Servall-Zentrifuge bei 470 U./Min. (2820 x g) 10 Min. gewaschen, in 2 ml Saccharoselösung mit einem Glashomogenisator nach Potter und Alvehjem bei niedrigen Drehzahlen schonend homogenisiert, auf 5 ml aufgefüllt, durch 6 Mullagen in ein Zentrifugenröhrchen filtriert und bei 150 U./Min. 3 Min. lang zentrifugiert. Der Niederschlag bestand aus Zelltrümmern (Debris) verschiedener Art wie Membranteilen, Muskelfasern, Tracheenbruchstücken. Der Überstand wurde in einer Servall- bzw. Spinco-Zentrifuge nach folgendem Schema fraktioniert:



Schließlich wurde jeder Niederschlag mit Wasser gewaschen, über P_2O_5 getrocknet, gewogen, in 0,3 ml Methanol suspendiert, in 1 ml Hyaminhydroxyd bei 60°C während 24 Stdn. aufgelöst und mit 15 ml Szintillatorlösung (+ 5 % Aerosil) versetzt. Bei allen Versuchen wurden auf die gleiche Weise die Blindwerte bestimmt, die von den Werten der Hauptversuche abgezogen wurden. Die gewonnenen Zellkerne zeigten bei der mikroskopischen Prüfung nur vereinzelt Muskelfasern und wenig Zelltrümmer (Debris).

Messung der Radioaktivität

Meßgerät: TriCarb Liquid Scintillation Counter Modell 314 LX der Firma Packard Co.. Meßlösung (vgl. S. 65): 7,0g PPO, 0,3g Dimethyl-POPOP, 100,0g Naphthalin für Szintillationszwecke in 1 Liter Dioxan p.a.. Innerer Standard: Toluol- 3H mit 104 000 Zerf./Min.. Wegen der starken Phosphoreszenz der alkalischen Lösungen wurden die Proben erst 2 Tage nach Verbleib in absoluter Dunkelheit in der Kühltruhe des Meßgerätes gezählt. Nulleffekt nach dieser Zeit: 140 - 170 Imp./Min. $\pm$ 1,5 %. Von jeder Probe wurden mindestens 8 000 Gesamtimpulse zur Erreichung eines gleichmäßigen Meßfehlers gezählt; der mittlere statistische Fehler schwankte dann beim Vergleich aller Proben zwischen $\pm$ 0,25 und $\pm$ 3,1 % (Berechnung vgl. S. 21, Fußnote). Um den unterschiedlichen Löscheffekt der verschiedenen Gewebearten und Zellfraktionen zu ermitteln, wurde jeder Probe ein innerer Standard zugefügt, wonach sich folgende Zählausbeuten in % ergaben:

Hämolymph 11,0; Epidermis 10,7; Fettkörper 9,2.

Zellfraktion	Epidermis	Fettkörper
Zellkerne	7,4	5,3
Mitochondrien	8,0	9,8
Mikrosomen	10,0	10,4
Überstand	3,6	2,3
Debris	7,6	5,6

Die einzelnen Meßergebnisse wurden mit diesen Zählausbeuten korrigiert.

D) ZUSAMMENFASSUNG

1. Für die Tritiummarkierung von Steroiden und des Insektenhäutungshormons Ecdyson wurde eine von Wenzel angegebene Modifikation der Wilzbach-Tritierung, die Kohle-Adsorptionsmethode, weiterentwickelt. Als methodische Verbesserung bei der Exposition der Adsorbate wurde eine Reaktionsampulle entworfen, in der man gleichzeitig mehrere Adsorbate dem Tritiumgas in porösen Nygonsäckchen aussetzen kann; ferner wurde ein Elutionsgemisch gefunden, mit dem man die adsorbierten Verbindungen beinahe quantitativ wiedergewinnen kann. Eine ausreichende Vorreinigung der Aktivkohle wurde als wichtig erkannt.
2. Bei der Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen zeigte sich, daß es eine optimale Beladungsdichte der auf der Kohle adsorbierten Substanzen und eine optimale Reaktionszeit gibt.
3. Am Beispiel der Steroide Δ^1 -5 α -Pregnendiol-(17 α .21)-trion-(3.11.20)-21-acetat und 5 α -Pregnandioli-(17 α .21)-trion-(3.11.20)-21-acetat wurden die Vorteile der Wenzel-Methode gegenüber dem Wilzbach-Verfahren bestätigt: 3,6 bis 5,5-fach höhere spezifische Aktivitäten der gereinigten Produkte wurden erzielt; der Anteil der radioaktiven Verunreinigungen war auf 1/3 bis 1/6 gesenkt. Einen entscheidenden Fortschritt brachte die Verwendung sehr großer Tritiummengen: Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten (161 und 252 μ C/mg) gehören zu den höchsten aller bislang nach Wilzbach tritierten Steroide.
4. Die Reinigung der geringen tritierten Substanzmengen (5 - 20 mg) gelang mittels präparativer Dünnschicht- und Papierchromatographie.
5. Das Ecdyson wurde in 2 Versuchen nach der Kohle-Methode tritiert. Obwohl zahlreiche Nebenprodukte entstanden, konnte das empfindliche Hormon mit den spezifischen Aktivitäten 2,7 und 6,6 μ C/mg biologisch aktiv gewonnen werden.
6. Als weiterer Fortschritt der Kohle-Methode wurde die Platin-Zohle-Katalyse eingeführt. Während bei dem Steroid Digitogenin eine 91-fache Steigerung der spezifischen Aktivität gegenüber der einer nach Wilzbach behandelten Probe inner-

halb 7,5 stdn. gelang, lag die Ausbeute eines ähnlichen Ecdyson-Versuches ($0,17 \mu\text{C}/\text{mg}$) erheblich unter der erwarteten.

7. Bei der Untersuchung der zeitlichen Verteilung von Ecdyson- ^3H auf Hämolymphe, Epidermis, und Fettkörper der Larven von *Calliphora erythrocephala* ergab sich, daß die Epidermis als Erfolgsorgan schon 45 Min. nach Injektion des Hormons ihr Konzentrationsmaximum erreicht. Danach wird das Hormon im Fettkörper inaktiviert bzw. gespeichert. Das Ergebnis steht in bemerkenswerter zeitlicher Übereinstimmung mit den Befunden Clevers, der die Puffinduktion in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus*larven schon 30 Min. nach Hormongabe feststellen konnte.
8. Die Verteilung von Ecdyson- ^3H auf Zellfraktionen der Epidermis und des Fettkörpers von *Calliphora*-Larven wurde untersucht. Während ein großer Teil der Partikel-gebundenen Radioaktivität beim Fettkörper in den Mikrosomen nachzuweisen war, fand sich in der Epidermis ein hoher Anteil in den Zellkernen. Damit wurde ein erster direkter Hinweis für die Richtigkeit der von Karlson formulierten Hypothese erbracht, wonach Steroidhormone durch Regulation von Genaktivitäten wirken. Der genaue Wirkungsmechanismus bleibt aber noch aufzuklären.

E) LITERATURVERZEICHNIS

- 1) A. Butenandt und P. Karlson, Z. Naturforschg. 9b, 389 (1954)
- 2) P. Karlson, Dtsch. med. Wschr. 86, 668 (1961)
- 3) G. M. Tomkins und E. S. Maxwell, Ann. Review of Biochemistry, Ann. Rev. Inc., Palo Alto/USA 1963, Vol. 32, p. 677.
- 4) U. Clever und P. Karlson, Exp. Cell Res. 20, 623 (1960)
- 5) U. Clever, Chromosoma (Berl.) 12, 607 (1961)
- 6) W. Beermann, Chromosoma (Berl.) 5, 139 (1952)
- 7) C. Pelling, Nature (London) 184, 655 (1959)
- 8) U. Clever, Developmental Biology 6, 73 (1963)
- 9) P. Karlson, Kurzes Lehrbuch d. Biochemie, Thieme-Verlag, Stuttgart 1964, p. 296; Dtsch. med. Wschr. 88, 1029 (1963)
- 10) R. C. Huang und J. Bonner, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 48, 1216 (1962)
- 11) P. Karlson und C. E. Sekeris, Biochem. Biophys. Acta 63, 489 (1962); C. Sekeris und P. Karlson, Arch. Biochem. Biophys. im Druck (1964)
- 12) S. Liao und H. G. Williams-Ashman, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 48, 1956 (1962)
- 13) J. D. Wilson, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 50, 93 (1963)
- 14) W. D. Noteboom und J. Gorski, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 50, 250 (1963)
- 15) H. Ui und G. C. Mueller, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 50, 256 (1963)
- 16) I. R. Tata, Nature (London) 197, 1167 (1963)
- 17) I. G. Wool und A. J. Munro, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 50, 918 (1963)
- 18) K. E. Wilzbach, U. Amer. chem. Soc. 79, 1013 (1957)
- 19) M. Wenzel und P. E. Schulze, Tritium-Markierung, Walter De Gruyter-Verlag, Berlin 1962
- 20) H. Simon, Angew. Chemie 73, 481 (1961)
- 21) M. W. Lindauer und H. A. Smith, J. Organ. Chem. 27, 2245 (1962)
- 22) K. E. Wilzbach, Tritium in the Physical and Biological Sciences Vol. II, p. 3, IAEA Symposium Wien 1961
- 23) M. Wenzel, H. Wollenberg und P. E. Schulze, Tritium in the Physical and Biological Sciences Vol. II, p. 37, IAEA Symposium, Wien 1961
- 24) H. Wollenberg und M. Wenzel, Z. Naturforschg. 18b, 8 (1963)
- 25) H. J. Ache und W. Herr, Z. Naturforschg. 17a, 631 (1962); dort weitere Literatur
- 26) J. R. Florini, J. biol. Chem. 235, 367 (1960)
- 27) S. Solomon, A. C. Carten und S. Lieberman, J. biol. Chem. 235, 351 (1960)

- 28) C.v.Holt, J.Voelker und L.v.Holt, Biochem.Biophys.Acta 38, 88 (1960)
- 29) F.L.Jackson, G.W.Kittinger und F.P.Krause, Nucleonics 18, 8, 102 (1960)
- 30) G.G.Cameron, N.Grassie und S.J.Thomson, J.chem.Soc.(London) 1411 (1960)
- 31) P.E.Schulze und M.Wenzel, Angw.Chemie 74, 777 (1962)
- 32) H.Wollenberg, Dissertation Berlin 1963
- 33) W.R.Aehnelt in "Houben-Weyl", Meth.d.org.Chem. Bd.I/1, Thieme-Verlag, Stuttgart 1958, p.193
- 34) M.Chadha, F.Woeller und R.Lemmon, UCRL- 10032 (1961)
- 35) K.Randerath, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962, p. 118
- 36) H.Gänshirt in "Dünnschicht-Chromatographie", Springer-Verlag 1962, p. 47 f.
- 37) H.Gänshirt, Privatmitteilung
- 38) P.Karlson, H.Hoffmeister, W.Hoppe und R.Huber, Liebigs Ann. Chem. 662, 1 (1963);
H.Hoffmeister, Dissertation München 1963
- 39) H.Simon, Z.Naturforschg. 18b, 360 (1963)
- 40) T.Meshi und T.Takahashi, Bull.Chem.Soc.Japan 35, 1510(1962)
- 41) E.S.Rothman, M.E.Wall und H.A.Walens, J.Amer.chem.Soc. 74, 5791 (1952)
- 42) M.Wenzel, H.Wollenberg und P.E.Schulze, Atompraxis 7, 89 (1961)
- 43) G.M.Schwab, Privatmitteilung
- 44) P.Riess und K.E.Wilzbach, J.physic.Chem. 62, 6 (1958)
- 45) J.Rydberg und A.Hanngren, Acta chem scand. 11, 1275 (1958)
- 46) S.Bergström und S.Lindstedt, Acta chem.scand. 11, 1275(1957)
- 47) C.Rosenblum, Nucleonics 17, 12, 80 (1959)
- 48) P.Karlson und H.Hoffmeister, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 331, 298 (1963)
- 49) H.Budzikiewicz und C.Djerassi, J.Amer.chem.Soc. 84, 1430 (1962)
- 50) J.M.Erikson und D.L.Forbess in "Steroid reactions", Holden-Day Inc., San Francisco 1963, p:327.
- 51) D.K.Fukushima und T.F.Gallagher, J.biol.Chem.198, 861(1952)
- 52) E.Schenk und E.Joachim, Experientia 18, 360 (1962)

- 53) W.Hughes, Autoradiography with Tritium, Symp.on tritium in tracer applications, New York 1957
- 54) Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag 1956, p. 720
- 55) B.Samuelson, Acta chem.scand. 14, 21 (1960)
- 56) P.Karlson und G.Hanser, Z. Naturforschg. 8b, 91 (1953)
- 57) A.Butenandt, H.Günther und E.Turba, Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 322, 28 (1960)
- 58) K.Leybold und HJ.Staudinger, Dtsch.med.Wschr. 87, 1989 (1962)
- 59) U.Westphal, Mechanism of Steroid Hormones, Pergamon Press, New York 1961, p. 33f.
- 60) V.B.Wigglesworth, Symp.Soc.Exp.biol. 11, 204 (1957)
- 61) H.A.Walens, A.Turner und M.E.Wall, Analyt.Chem. 26, 325(1954)
- 62) J.Rydberg, Acta chem. scand. 12, 399 (1958)
- 63) M.Wenzel, Atompraxis 7, 86 (1961).

L E B E N S L A U F

Am 18. März 1937 wurde ich als Sohn des Apothekers Dr. Wilhelm Maurer und seiner Ehefrau Senta, geb. Roessle, in Tübingen/Neckar geboren. Von 1943 bis 1947 besuchte ich die Volksschule in Ulm/Donau. Anschließend trat ich in das Humanistische Gymnasium der Stadt Ulm ein und legte dort im März 1956 die Reifeprüfung ab. Nach zwei Lehrjahren in der Schloß-Apotheke in Heidenheim/Brenz bestand ich im März 1958 die pharmazeutische Vorprüfung in Stuttgart und begann im Sommer-Semester 1958 das Studium der Pharmazie an der Universität München. Dort legte ich im Mai 1961 das pharmazeutische Staatsexamen ab. Während meines Studiums war ich vier Semester lang Fachschaftsleiter der Fachschaft Pharmazie. Im November 1961 begann ich auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Peter Karlson und mit Einwilligung und Förderung von Herrn Prof. Dr. Adolf Butenandt am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München mit der vorliegenden Arbeit.

